



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

Propiedades fotosensibilizadoras de
lumazina: oxidación fotoinducida de
nucleótidos y efecto fotodinámico
sobre células HeLa

Bioquímica María Paula Denofrio

Directores: Dra. Carolina Lorente y Dr. Andrés H. Thomas

2011

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas bajo la dirección de la Dra. Carolina Lorente y la codirección del Dr. Andrés H. Thomas. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

A mi esposo Franco y nuestra hija Amparo

A mis padres y hermanos

A mis sobrinos

Mi reconocimiento

A la Facultad de Ciencias Exactas por la educación pública y gratuita que permitió mi formación de grado y de postgrado.

Al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) por haberme brindado el espacio físico y el equipamiento para la realización de este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y Tecnología (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por financiar los proyectos de investigación que dieron marco al presente trabajo de tesis.

A la ANPCyT y al CONICET, por el otorgamiento de las becas que me permitieron dedicarme en forma exclusiva a este trabajo de tesis.

Al grupo Coimbra y *The Danish National Research Foundation*, por haber financiado mis estadías de investigación en la Universidad de Aarhus, Dinamarca.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT, Argentina) y ECOS-Sud (Francia), en el marco del proyecto A07E07, por financiar mi estadía en la Universidad Paul Sabatier (Toulouse III), Francia.

Mi agradecimiento

A la Dra. Carolina Lorente, por darme la oportunidad, por alentarme día a día, por brindarme todo el tiempo necesario para discutir resultados y, principalmente, por su apoyo y paciencia.

Al Dr. Andrés H. Thomas, por toda la confianza depositada en mí y por permitirme realizar la tesis en su grupo, por transmitirme todos sus conocimientos, por haber tenido siempre las puertas abiertas para mí y por todas las ideas y discusiones. Por su dedicación, esfuerzo y generosidad en este camino hacia la tesis.

Al Prof. Dr. Peter R. Ogilby, director del *Center for Oxygen Microscopy and Imaging* (COMI), por permitirme trabajar en sus laboratorios, poniendo a mi disponibilidad todo el equipamiento e infraestructura de dicho instituto. También por haber confiado en mí, dándome la posibilidad de trabajar libremente.

A la Dra. Esther Oliveros, directora del *Laboratoire des Interactions Moléculaires Réactivité Chimique et Photochimique* (IMRCP), por haberme permitido disponer del equipamiento e infraestructura de dicho instituto, por supervisar mi trabajo en sus laboratorios, y principalmente por hacer que mi tiempo en Francia haya sido tan agradable.

Al Dr. Franco Cabrerizo, por participar crítica y desinteresadamente en mi formación durante estos años, por su paciencia y por acompañarme hasta cualquier hora durante los experimentos con el láser y el microscopio.

A mis compañeros “pteridinas” y “ex-pteridinas”, Andrés, Caro, Lau, Mari, Gabi y Mariana P. por soportarme todos los días, los buenos y sobre todo, los malos. Por todos estos años de alegría y de llanto, por el compañerismo y fundamentalmente por estos últimos tiempos en los que la ayuda de cada uno de ustedes resultó invaluable.

A Laura Dántola, por brindarme todo tu apoyo desde el comienzo, por contenerme y por cuidarme. Gracias por tu energía avasallante, por tu buena predisposición y tu generosidad, a toda hora y en todo lugar.

A Mariana Vignoni, por estar siempre dispuesta a dar una mano, por las charlas eternas y sinceras y por alentarme en todo momento a seguir adelante. Mil gracias amiga!

A Gabriela Petroselli, por ayudarme en los primeros pasos con los nucleótidos. Por tu preocupación sincera y predisposición.

A M. P. Serrano por tu generosidad y por la buena onda que trajiste a la “casita”.

A Micaela González por estar siempre dispuesta, y ayudarme con la cátedra todo este tiempo.

A Daniela Nichela, Luciano Carlos, Sebastián García Einschlag y Gustavo Ruiz por su predisposición a responder a varias de mis dudas, y por los buenos momentos compartidos.

Al Dr. Jacob Arnbjerg, Rasmus Toftegaard y Dra. Sonja Hatz, por su invaluable ayuda con el manejo de los equipos de láser y el microscopio, sin la cual gran parte de este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Patricia Vicendo, Catherine Claparols y Nathalie Martins-Froment, por su colaboración en los experimentos de EPR y Espectrometría de masas.

Al Dr. Alberto Rizzi, por su desinteresado asesoramiento científico en la comprensión de la técnica de EPR, por estar siempre dispuesto a ayudarme y, fundamentalmente, por su sentido del humor y los buenos momentos compartidos.

A “Maite” Maurette, por su alegría, su generosidad y por cuidarme como a una hija, haciendo que mis días en Toulouse hayan sido tan agradables.

A mis compañeros de trabajo integrantes del primer piso y la “casita” del INIFTA, por todo el afecto y compañerismo recibidos y por tantos buenos momentos compartidos.

A mis compañeros de trabajo en Toulouse y Dinamarca, por brindarme su ayuda y hacer de mis estadías momentos muy agradables.

A Juli P.G, por convencerme que se puede, por alentarme todo el tiempo, por hacer que no me sienta tan “patito feo” y por mil cosas más que hacen que me sienta orgullosa de tenerla como amiga.

A Mariana, por su incondicionalidad, su buen humor y por estar siempre pendiente de mis cosas.

A Vic, Lau y Fer por tan lindos momentos juntas y por estar siempre a pesar de las distancias.

A mis amigas de toda la vida Bere y Luci, por acompañarme todos estos años comprendiendo cada una de mis ausencias y por su incondicional amistad.

A mis amigas de la Facultad Euge y Caro, porque siempre puedo contar con ustedes.

A Ana R, Corita, Antu y Juli P, por empujarme en el último tramo de la carrera y continuar tan cerca a pesar del paso del tiempo.

A Romi, Gastón, Caro, Amanda, Gonzi y Jorge, por tanta ayuda y por estar siempre presentes.

A mis padres, por dárme todo y más. Por apoyarme día tras día, por priorizar mis cosas por sobre las suyas y, fundamentalmente, por haberme enseñado a amar lo que uno hace. Este logro tan importante en mi vida nunca lo hubiera alcanzado sin el infinito apoyo de ustedes. Gracias. Gracias!

A mis hermanos Seba y Ger, por compartir conmigo la vida y ser incondicionales. A Romi y Car, porque siempre puedo contar con ustedes.

A mi abuela, por tanto amor. A mis tíos, por disfrutar con cada uno de mis logros.

A mis sobrinos Juanse, Bruno, Bernu, Jose y a mi ahijada Vicky, por el amor que me dan a pesar de mis ausencias.

A Franco, por elegirme día a día. Por tu incondicional apoyo, tu inagotable paciencia y por todo el amor que me das.

Por último....a Amparo, mi solcito, por iluminar todos mis días con tu sonrisa y por todo el amor que me das a pesar todos estos meses de encierro.

ÍNDICE

1. Introducción a la fotoquímica y fotosensibilización	01
1.1 Procesos fotofísicos	01
1.2 Procesos fotoquímicos	04
1.3 Fotosensibilización	05
1.3.1 Transferencia de energía	05
1.3.2 Transferencia de electrones	08
1.4 Oxidaciones fotosensibilizadas	09
1.4.1 Mecanismos Tipo I	10
1.4.2 Mecanismos Tipo II	10
1.5 Oxígeno singlete	10
1.5.1 Estados excitados del oxígeno	11
1.5.2 Formación de oxígeno singlete	12
1.5.3 Desactivación del oxígeno singlete	13
1.5.4 Reacciones del oxígeno singlete	14
1.6 Referencias	15
2. Fotosensibilización de biomoléculas	17
2.1 Radiación UV proveniente del sol que alcanza la superficie terrestre	17
2.2 Bases nitrogenadas, nucleósidos y nucleótidos	18
2.2.1 Estructura química	19
2.2.2 Equilibrios ácido-base	21
2.2.3 Espectros de absorción	22
2.3 Ácido desoxirribonucleico	23
2.3.1 Estructura química	23
2.4 La radiación y sus implicancias biológicas	24
2.5 Tipos de mecanismos que participan en el daño al ADN por radiación	25
2.6 Daño directo al ADN	27
2.7 Daños al ADN mediante procesos fotosensibilizados	29
2.7.1 Transferencia de energía de un sensibilizador al ADN	29
2.7.2 Fotooxidaciones Tipo I	30
2.7.3 Fotooxidaciones Tipo II	33

2.8 Algunas aplicaciones de las reacciones fotosensibilizadas en medicina	34
2.9 Referencias	35
3. Propiedades químicas y bioquímicas de Lumazinas	37
3.1 Estructura química y nomenclatura de las pteridinas	37
3.2 Propiedades ácido-base de las pteridinas	39
3.3 Espectros de absorción	41
3.4 Lumazinas en la naturaleza	42
3.4.1 Síntesis de riboflavina	43
3.4.2 Pterin-deaminasa	44
3.4.3 Antenas	44
3.5 Referencias	45
4. Fotofísica, fotoquímica y propiedades fotosensibilizadoras de pteridinas	47
4.1 Fluorescencia de lumazina: espectros de emisión y excitación	47
4.1.1 Análisis de soluciones extremadamente alcalinas (pH = 14)	48
4.1.2 Análisis de soluciones alcalinas (pH = 10)	48
4.1.3 Análisis de soluciones moderadamente ácidas (pH = 6,8 y 5)	48
4.1.4 Análisis de soluciones extremadamente ácidas (pH = 1,5)	49
4.2 Fosforescencia de Lumazina a temperatura ambiente y a 77 K	50
4.3 Propiedades fotosensibilizadoras de pteridinas	51
4.3.1 Fotosensibilización de bases púricas y desoxirribonucleótidos por pterinas	51
4.3.2 Fotosensibilización de ADN eucariota por pterinas	53
4.3.2.1 Hidroxilación de desoxiguanosina en ADN fotoinducida por derivados pterínicos	53
4.3.3 Fotosensibilización de ADN plasmídico por pterinas	54
4.3.3.1 Fotosensibilización del plásmido pUC18 por pterina	54
4.3.3.2 Fotosensibilización del plásmido PBR 322 por 6-carboxipterina	55
4.4 Referencias	55

PARTE II: MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

5. Preparación e irradiación de soluciones	57
5.1 Reactivos	57
5.2 Preparación de soluciones	58

5.2.1 Soluciones en presencia de oxígeno	58
5.2.2 Soluciones en ausencia de oxígeno	59
5.2.3 Soluciones en agua deuterada	59
5.2.4 Soluciones con secuestradores selectivos	60
5.3 Determinación del coeficiente de absorción molar	61
5.4 Irradiación y análisis de soluciones	62
5.4.1 Irradiación con lámparas <i>Rayonet</i>	62
5.4.2 Irradiación con lámpara de Xe-Hg	63
5.4.3 Metodología general para el análisis de soluciones	63
5.5 Determinación del rendimiento cuántico de una reacción	64
5.6 Actinometrías	66
5.7 Referencias	70
6. Análisis de las soluciones irradiadas	71
6.1 Espectrofotometría UV-visible	71
6.1.1 Análisis de soluciones irradiadas	72
6.1.2 Titulación espectrofotométrica	73
6.2 Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)	75
6.3 Espectrometría de masas por ionización <i>electrospray</i> (ESI-MS)	77
6.4 Detección de H ₂ O ₂	78
6.4.1 Reactivo de trabajo	79
6.4.2 Metodología de trabajo	80
6.4.3 Curva de calibración	80
6.5 Medida electroquímica de oxígeno disuelto	81
6.6 Referencias	83
7. Técnicas espectroscópicas avanzadas	85
7.1 Estudios por <i>single photon counting</i>	85
7.1.1 Fluorescencia en estado estacionario	85
7.1.2 Estudio resuelto en el tiempo de la fluorescencia	88
7.1.3 Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia	90
7.1.4 Desactivación de fluorescencia	91
7.2 Estudios de absorción triplete-triplete por fotólisis de destello láser	96
7.2.1 Conceptos teóricos	96

7.2.2 Descripción del equipo	98
7.2.3 Preparación de las muestras	100
7.2.4 Decaimiento del triplete y espectros de transientes	101
7.3 Estudios de oxígeno singlete	101
7.3.1 Introducción	101
7.3.2 Descripción del equipo usado en las determinaciones resueltas en el tiempo	103
7.3.3 Determinación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete por Lumazina	104
7.3.4 Determinación de la constante de velocidad de desactivación total de oxígeno singlete por Lumazina	106
7.3.5 Caracterización del estado excitado triplete de Lumazina en medio ácido	107
7.4 Estudios de Resonancia Paramagnética electrónica	108
7.4.1 Teoría básica de EPR: Introducción a la espectroscopía EPR	109
7.4.2 Descripción del equipo	112
7.4.3 Aplicaciones de EPR	114
7.4.4 Uso particular de EPR en el presente trabajo de tesis	115
7.5 Referencias	116
8. Preparación, cultivo y fototoxicidad sobre células HeLa	117
8.1 Preparación y cultivo de células HeLa	117
8.2 Incubación de células HeLa con Lumazina	118
8.3 Estudio de la captación del fotosensibilizador por células HeLa: preparación y análisis de los extractos celulares	119
8.4 Irradiación	119
8.5 Evaluación de la fototoxicidad	120
8.5.1 Ensayos con Rodamina 123	120
8.5.2 Ensayos de exclusión con azul de tripano	122
8.5.3 Microscopía	122
8.5.4 Análisis estadístico	123
8.6 Referencias	124

PARTE III: Resultados

9. Propiedades fotofísicas de Lumazina	125
9.1 Espectros de absorción y constantes de disociación ácida	126
9.2 Fluorescencia de Lumazina y caracterización de su primer estado excitado	
singlete	127
9.2.1 Espectros de emisión	127
9.2.2 Rendimiento cuántico de fluorescencia	128
9.2.3 Espectros de excitación	129
9.2.4 Tiempos de vida de fluorescencia	130
9.3 Caracterización del estado excitado triplete de Lumazina	132
9.3.1 Experimentos en medio alcalino	132
9.3.2 Experimentos en medio ácido	135
9.4 Desactivación de los estados excitados singlete y triplete de Lumazina por yoduro	138
9.5 Referencias	141
10. Fotoquímica de Lumazina y generación de especies reactivas de oxígeno	143
10.1 Irradiación en ausencia de oxígeno	143
10.2 Irradiación en presencia de oxígeno	146
10.3 Oxígeno singlete	149
10.3.1 Desactivación total de oxígeno singlete por Lumazina	150
10.3.2 Rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete por Lumazina	151
10.4 Anión superóxido	154
10.4.1 Experimentos en presencia de la enzima superóxido dismutasa	154
10.4.2 Experimentos de EPR	156
10.5 Mecanismos de reacción	159
10.6 Referencias	160
11. Fotosensibilización de 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato por Lumazina	161
11.1 Análisis espectroscópico	162
11.1.1 Experimentos en medio ácido	162
11.1.2 Experimentos en medio alcalino	163
11.2 Análisis cromatográfico	164
11.2.1 Experimentos en medio ácido	164
11.2.2 Experimentos en medio alcalino	168

11.3 Producción de H ₂ O ₂	169
11.4 Participación del oxígeno	170
11.4.1 Evaluación del consumo de oxígeno	170
11.4.2 Dependencia del consumo de dAMP con la concentración de oxígeno	172
11.5 Participación del oxígeno singlete	174
11.6 Participación del anión superóxido	176
11.6.1 Experimentos en presencia de la enzima superóxido dismutasa	177
11.6.2 Experimentos de EPR	178
11.7 Participación del estado excitado triplete de Lumazina	179
11.7.1 Fotólisis estacionaria en presencia de yoduro de potasio	181
11.7.2 Desactivación del estado excitado triplete de Lumazina por dAMP	181
11.8 Investigación de productos por la técnica HPLC acoplada a espectrometría de masa por ionización <i>electrospray</i>	184
11.9 Mecanismo de reacción	190
11.10 Referencias	192
12. Fotosensibilización de 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato por Lumazina	193
12.1 Análisis espectroscópico	194
12.2 Análisis cromatográfico	195
12.3 Producción de H ₂ O ₂	200
12.4 Participación del oxígeno	202
12.4.1 Evaluación del consumo de oxígeno	202
12.4.2 Dependencia del consumo de dGMP con la concentración de oxígeno	203
12.5 Participación del oxígeno singlete	205
12.6 Participación del anión superóxido	208
12.7 Participación del estado excitado triplete de Lumazina	209
12.7.1 Fotólisis estacionaria en presencia de yoduro	209
12.7.2 Desactivación del triplete de Lumazina por dGMP	210
12.8 Mecanismos de reacción	212
12.9 Referencias	214
13. Efecto fotodinámico de Lumazina sobre células HeLa	215
13.1 Estudio de la captación celular del fotosensibilizador	215
13.2 Evaluación del efecto fotodinámico de Lumazina mediante el ensayo de	

Rodamina 123	219
13.3 Evaluación del efecto fotodinámico de Lumazina mediante el ensayo de Azul de Tripano	222
13.4 Referencias	224
CONCLUSIONES	225

Prólogo

Se ha demostrado que la luz UV es un eficiente agente genotóxico capaz de causar serios daños a nivel celular, incluyendo mutaciones, lo que conduce al desarrollo de alteraciones y/o patologías en los diferentes sistemas vivos. Sin embargo, la mayor parte de la radiación UV que llega a la superficie de la tierra no es absorbida por las principales biomoléculas constitutivas de las células (nucleótidos, aminoácidos, ADN, proteínas, etc.). De esta manera, las alteraciones observadas en dichos componentes en los sistemas vivos cuando los mismos son expuestos a radiación UV se deben, principalmente, a reacciones fotosensibilizadas. Estas reacciones o procesos abarcan una serie de fenómenos desencadenados por la luz en los cuales una sustancia (fotosensibilizador) se excita electrónicamente, luego de absorber radiación electromagnética, y genera cambios químicos en otra sustancia que no absorbe dicha radiación (sustrato, molécula blanco o blanco de acción).

En la naturaleza existen numerosos compuestos que pueden actuar como fotosensibilizadores, capaces de captar la energía de la radiación UV y, consecuentemente, producir modificaciones sobre los componentes celulares. Existe un gran número de compuestos distribuidos en las células que pueden actuar como fotosensibilizadores endógenos de biomoléculas. Por otro lado, las bebidas, alimentos, medicamentos, etc. son una fuente exógena de fotosensibilizadores. En particular, las pteridinas se encuentran en las células cumpliendo numerosas funciones, poseen estructura heterocíclica y absorben luz UV. Esta familia de compuestos incluye a las lumazinas, que se encuentran en los sistemas biológicos como precursores metabólicos, grupos prostéticos de algunas proteínas y productos de la degradación metabólica de pterinas.

Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo de tesis es estudiar los procesos fotosensibilizados por Lumazina sobre biomoléculas y células eucariotas. Para ello, en primer lugar, se realizó la caracterización de algunas propiedades fotofísicas y fotoquímicas de Lumazina. A continuación se mencionan los objetivos particulares que trazaron el rumbo de las tareas y experiencias descriptas en esta tesis:

- ✓ **Estudiar y caracterizar las propiedades fotoquímicas y fotofísicas de Lumazina.**
 - Caracterización de los estados electrónicos excitados singletes y tripletes.
 - Evaluación del comportamiento fotoquímico de Lumazina bajo condiciones de irradiación continua con radiación UV.
 - Evaluar la capacidad que presenta Lumazina de generar especies reactivas de oxígeno, en particular, oxígeno singlete, anión superóxido y peróxido de hidrógeno.
- ✓ **Analizar la participación de Lumazina en diferentes procesos u oxidaciones fotosensibilizadas de implicancia biológica.**
 - Estudio de procesos de degradación de nucleótidos purínicos fotoinducida por Lumazina, y dilucidación de los mecanismos implicados. Análisis de la influencia del pH en los mecanismos de reacción. Caracterización de los fotoproductos generados en la oxidación fotosensibilizada.
- ✓ **Estudio de la actividad fotodinámica de Lumazina sobre células eucariotas.**
 - Evaluación de la incorporación celular y fototoxicidad de Lumazina, usando cultivos celulares.

Estructura y diseño del trabajo de tesis

El presente trabajo de tesis doctoral está dividido en tres partes, cada una de las cuales contiene varios capítulos. A continuación se presentará un breve resumen sobre el contenido de cada una de las partes:

Parte I: Introducción. En los primeros capítulos de esta sección se desarrollan brevemente algunos aspectos básicos de fotoquímica, se explican los distintos mecanismos que pueden participar en las reacciones fotosensibilizadas y se resumen las reacciones en las que el ADN y sus componentes son dañados por la radiación. Posteriormente, se muestran algunas propiedades químicas y bioquímicas de lumazinas. Para finalizar esta sección, se resumen los estudios sobre la fotofísica y fotoquímica de pteridinas llevados a cabo hasta el momento, enfatizando los antecedentes en procesos fotosensibilizados.

Parte II: Materiales y métodos experimentales. En esta sección se describen las principales técnicas y metodologías experimentales empleadas a lo largo de este trabajo de tesis, junto con el desarrollo de las ecuaciones necesarias para el análisis e interpretación de los resultados.

Parte III: Resultados. Corresponde a la presentación, análisis y discusión de los resultados experimentales obtenidos. Se presentan los resultados correspondientes a la caracterización fotofísica de los estados electrónicamente excitados (singlete y triplete) de Lumazina en solución acuosa, conjuntamente con los mecanismos o vías de desactivación de los mismos (Capítulo 9). Se presenta los estudios realizados con Lumazina bajo irradiación UV, junto con el análisis y cuantificación de la capacidad de producción de especies reactivas del oxígeno (Capítulo 10). Posteriormente a la caracterización fotoquímica y fotofísica de Lumazina, se presentan los estudios de fotooxidación. En primer lugar, se analizan los daños fotoinducidos por Lumazina sobre los nucleótidos purínicos 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (Capítulo 11) y 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (Capítulo 12). En estos dos capítulos se plantean los mecanismos de reacción involucrados y se analiza la naturaleza de los estados excitados que participan en dichos mecanismos. Finalmente, se presentan experimentos de fototoxicidad sobre células eucariotas HeLa, a fin de evaluar si existe efecto fotodinámico de Lumazina (Capítulo 13).

Capítulo 1

Introducción a la fotoquímica y fotosensibilización

La energía proveniente de la radiación electromagnética puede ser absorbida por las moléculas. De esta manera, cuando un fotón de energía adecuada incide en una especie o molécula absorbente, un electrón es promovido desde su estado fundamental a un estado electrónico excitado. Ciertamente, este proceso, al que se denominará en adelante excitación, conduce el pasaje desde un estado electrónico de menor energía, a otro de mayor energía, lo que ocasiona una redistribución de su configuración electrónica fundamental.

Una molécula en un estado electrónicamente excitado, de mayor contenido energético, se encuentra en una situación muy inestable. Consecuentemente, el sistema evolucionará siguiendo diferentes vías de desactivación de manera de perder tal exceso de energía. Estas vías involucran diversos procesos fisicoquímicos que pueden clasificarse en dos grandes grupos: *procesos fotofísicos*, en los cuales la molécula permanece químicamente inalterada luego de la desactivación electrónica, y *procesos fotoquímicos*, en los cuales se produce una transformación química sobre la molécula.

1.1. Procesos fotofísicos

Existen diferentes vías de desactivación o desexcitación física posibles. La más favorable dependerá de cada tipo de molécula, de la naturaleza de los estados electrónicos involucrados y del entorno en el cual se encuentra la molécula en cuestión. Las transiciones que puede sufrir un estado electrónicamente excitado suelen ser muy rápidas y pueden clasificarse en las siguientes categorías:

(i) *Transiciones radiativas*: en las cuales la molécula excitada emite radiación electromagnética, retornando así a su estado electrónico de menor energía. La cantidad de energía emitida es menor que la utilizada para generar el estado excitado.

(ii) *Transiciones no radiativas*: un estado previamente excitado se convierte en otro de menor energía, sin emisión de radiación, por transferencia intramolecular de energía.

(iii) *Procesos de desactivación física*: involucra la transferencia de energía de la molécula inicialmente excitada a otra/s molécula/s que se encuentran presentes en el medio.

Cada uno de estos tipos de desactivación física, a su vez, incluye diferentes

procesos. En la Figura 1.1 se presenta un diagrama de Jablonski modificado,¹ que describe la mayor parte del mecanismo de relajación para las moléculas en su estado excitado, mediante un esquema simplificado de niveles de energía. Las transiciones radiativas se indican con flechas rectas (\rightarrow) y las no radiativas con flechas onduladas (\rightsquigarrow).²

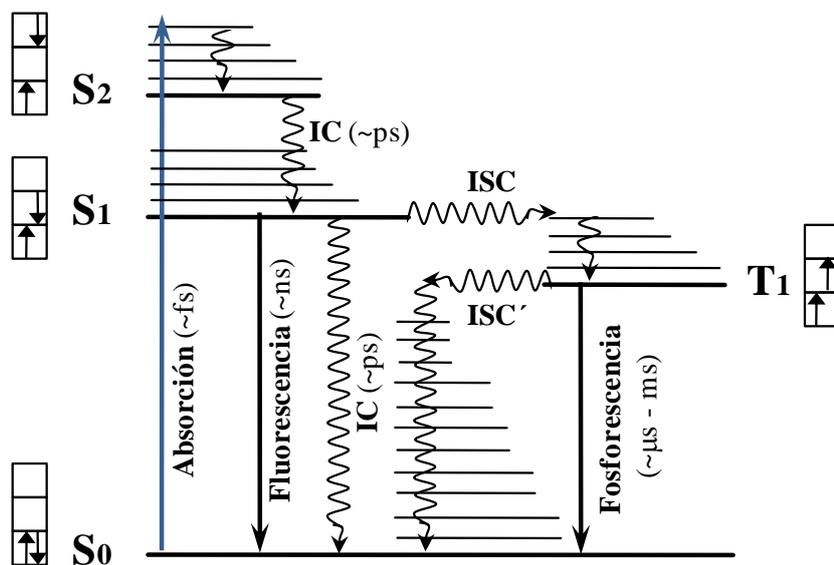


Figura 1.1: Diagrama de Jablonski modificado. En este esquema se representan las transiciones que involucran absorción o emisión de energía electromagnética con flechas rectas, mientras que las transiciones no radiativas con flechas onduladas. Los niveles vibro-rotacionales asociados a cada estado se representan con líneas horizontales.

Todas las moléculas orgánicas están en un estado electrónico basal con multiplicidad de *spin* de tipo singlete (S₀). Como se mencionó anteriormente, la absorción de radiación electromagnética promueve el pasaje de un electrón a un orbital de mayor energía. Si esta transición electrónica tiene lugar sin cambio en la multiplicidad de *spin* total, el estado electrónico excitado alcanzado continúa siendo de tipo singlete (representado ahora por S₁). Por el contrario, si en la transición electrónica ocurre un cambio de *spin*, el estado electrónico alcanzado será de multiplicidad triplete (T₁). En un proceso de excitación electrónica existe una preferencia sobre la conservación del *spin*, por ello las bandas de absorción más intensas en un espectro corresponden a transiciones del tipo S₀ → S₁. Por el contrario, las transiciones S₀ → T₁ están “prohibidas por *spin*”. Esto significa que dichas transiciones tienen una probabilidad de ocurrencia extremadamente baja, lo que deriva en transiciones extremadamente débiles. Usualmente la excitación al primer estado excitado (S₁) es el proceso más favorable, sin embargo, muchas moléculas

presentan transiciones $S_0 \rightarrow S_2$. Estos estados excitados de mayor energía también se representan en la Figura 1.1.

Las transiciones no radiativas pueden ocurrir entre estados de igual multiplicidad, denominándose *conversión interna* (IC, del inglés *internal conversion*), o de distinta multiplicidad, denominándose *entrecruzamiento de sistemas* (ISC, del inglés *intersystem crossing*). Las transiciones horizontales entre estados, por IC o ISC, dejan a la molécula con un exceso de energía vibro-rotacional. En solución esta energía es rápidamente removida por colisiones con moléculas del solvente, en un proceso denominado relajación vibracional (VR).

Los procesos radiativos son la *fluorescencia* y la *fosforescencia*. En ambos fenómenos, moléculas que se encuentran en estado excitado por haber absorbido radiación, emiten radiación de mayor longitud de onda. La emisión se denomina *fluorescencia* si la transición ocurre desde un estado electrónico de igual multiplicidad de *spin* que el estado final, siendo así una transición fuertemente permitida y por lo tanto muy rápida. Por otro lado, la emisión conocida como *fosforescencia* es una transición entre estados de diferente multiplicidad de *spin*, es decir, una transición teóricamente prohibida. Sin embargo, la transición puede ocurrir, pero generalmente es de menor intensidad y ocurre más lentamente. Las propiedades de la radiación emitida pueden evaluarse experimentalmente para revelar detalles de la naturaleza y el comportamiento de los estados excitados. Típicamente, la radiación emitida ocurre a mayores longitudes de onda que la radiación inicialmente absorbida. Esto se debe a que el estado excitado inicialmente formado, rápidamente se equilibra térmicamente para alcanzar el menor estado electrónico vibracional dentro de dicho estado.¹

Los procesos de *desactivación física* son otro grupo de procesos de desexcitación física, que no están representados en el diagrama de Jablonski modificado de la Figura 1.1. Cuando en el medio se encuentra otra molécula capaz de interactuar con el estado excitado, aparece un nuevo camino de desactivación que compite con los descritos anteriormente. Esta segunda molécula se conoce usualmente como *desactivador o interceptor*. Por lo tanto, una molécula excitada puede interactuar con el desactivador dando lugar a la desactivación sin emisión de radiación. Este fenómeno involucra generalmente la transferencia de energía de la molécula excitada a otra molécula en una colisión. Consecuentemente, la intensidad de la radiación se reduce en una cantidad dependiente de la concentración del desactivador y de la eficiencia del proceso de desactivación.

Adicionalmente, la presencia del desactivador aumenta la velocidad del decaimiento de la emisión. Así, medidas de la intensidad de la emisión y su dependencia en el tiempo proveen información de las velocidades de reacción entre la molécula excitada y el desactivador.³

1.2 Procesos fotoquímicos

Un proceso fotoquímico se inicia con la absorción de radiación electromagnética. La absorción de un fotón lleva a una molécula a un estado de mayor energía que aumenta sus posibilidades de reacción, respecto de la misma molécula en estado basal.⁴

Una reacción que se desencadena por absorción de radiación electromagnética se denomina “*reacción fotoquímica*”. Estas reacciones pueden ser muy diversas: la energía puede ser usada para romper una unión química, para superar una energía de activación, etc. Queda claro que la reactividad química de una molécula en un estado excitado puede ser muy diferente a la reactividad química de la misma molécula en su estado basal.

De acuerdo al tipo de transformación, las reacciones fotoquímicas pueden clasificarse en distintas categorías: (i) *Reacciones de disociación*: en las cuales la energía de la radiación debe ser suficiente para producir la ruptura de un enlace, lo que conduce a la fragmentación de la molécula excitada. (ii) *Reacciones o procesos intermoleculares*: aquí la excitación de una molécula favorece la reacción con una segunda molécula, lo cual no es posible para el estado fundamental. En estos procesos se incluyen reacciones directas entre la molécula excitada y una segunda molécula, como así también procesos de transferencia de electrones entre ambas moléculas. (iii) *Procesos intramoleculares*: una parte de una molécula en estado excitado interacciona con otra parte de la misma molécula. Este tipo de procesos conduce a cambios estructurales de la molécula y/o procesos de isomerización. (iv) *Procesos de ionización*: la energía de la radiación produce la separación de un electrón y, consecuentemente, la ionización de la molécula excitada. Estos procesos presentan cierta similitud con los descritos en el punto (i). La diferencia radica en que, en lugar de producirse dos fragmentos neutros, aquí se genera un ión y un electrón. De esta manera, la molécula ionizada puede sufrir una transformación química; por ejemplo, por reacción con otra molécula.

1.3 Fotosensibilización

Se denomina fotosensibilización a todo proceso por el cual una especie química sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como resultado de la absorción inicial de radiación electromagnética por otra especie química que se denomina *fotosensibilizador* o, simplemente, sensibilizador (Sens).^{2,5} Si bien esta es una definición amplia, es también la más aceptada en el campo de la fotoquímica general y aplicada a procesos fotobiológicos. Por lo tanto, es la que se utilizará a lo largo del presente trabajo de tesis.

Los procesos fotosensibilizados pueden ocurrir a través de diversos mecanismos, clasificados en dos grandes categorías: procesos de transferencia de energía y procesos de transferencia de carga. A continuación se detallan brevemente ambos tipos de mecanismos.

1.3.1 Transferencia de energía

La fotosensibilización por transferencia de energía es un proceso en el cual una determinada especie química (denominada “dador”) en su estado electrónicamente excitado (como consecuencia de la absorción previa de radiación electromagnética), se desactiva transfiriendo energía a una segunda especie química (denominada “aceptor”). Consecuentemente, esa energía produce en el aceptor una transición electrónica poblando un estado excitado (típicamente los de más baja energía, S_1 o T_1), desde el cual sufre algún fenómeno químico o físico. En el Esquema 1.1 se representa la secuencia de reacciones involucradas en este mecanismo. En dicho esquema, el sensibilizador (Sens) representa la especie dadora de energía, mientras que A (el aceptor) representa a la especie química que sufre procesos químicos o físicos ulteriores sin haber absorbido, inicialmente, la radiación electromagnética.

Brevemente, en este proceso A resulta “sensibilizada” por radiación de una longitud de onda no absorbida por dicha especie, sino por Sens. La energía de excitación es obtenida por Sens mediante la absorción de un fotón, para generar un estado excitado del sensibilizador (Sens*) (Reacción 1), y posteriormente la energía se transfiere al aceptor A (Reacción 2). Dado que la pérdida de energía vibracional es muy rápida, la energía que Sens* transfiere a A es menor que la energía absorbida inicialmente. De esta forma, las moléculas excitadas del sensibilizador retornan al estado basal en presencia de moléculas A adecuadas. Posteriormente, A* puede volver a su estado fundamental desactivándose a través de cualquiera de las vías fotofísicas descritas en la Sección 1.1 (Reacciones 3-5) o bien sufrir algún cambio químico (Reacción 6).



Esquema 1.1: Proceso fotosensibilizado que ocurre a través de un mecanismo de transferencia de energía.

La transferencia intermolecular de energía de una especie a otra, conduce a la excitación de especies no absorbentes, a una longitud de onda dada, que pueden involucrarse en cambios químicos que no ocurren en ausencia de radiación y del sensibilizador. Por otra parte, esta vía diferente de excitación puede poblar estados excitados distintos a los obtenidos por absorción directa, y por lo tanto, se pueden observar otro tipo de reacciones químicas.⁶

La transferencia de energía puede ocurrir, a su vez, a través de distintos mecanismos:⁷

(i) Transferencia de energía radiativa: Se define como “la transferencia de la energía de excitación por desactivación radiativa de la molécula dadora y reabsorción de la radiación emitida por una molécula aceptora.”²

En este caso, la etapa 2 del mecanismo general del Esquema 1.1 ocurre en dos pasos. La emisión de Sens* es a continuación absorbida por A (Reacciones 7 y 8). Para que ocurra este proceso es necesario que el espectro de emisión de Sens* se solape, al menos parcialmente, con el espectro de absorción de A (Figura 1.2). Por otra parte, no es necesario que ambas moléculas compartan lo que se denomina “caja de solvente”.



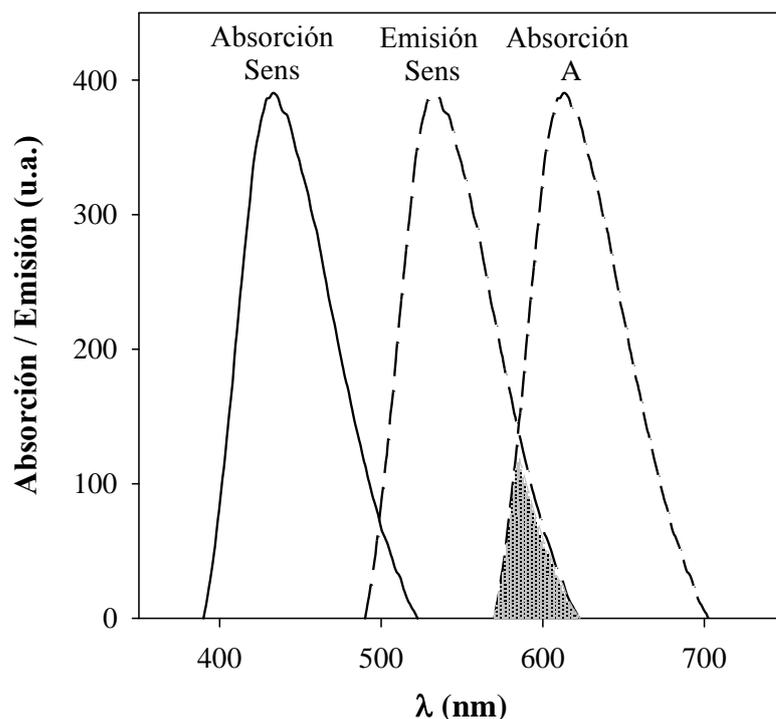


Figura 1.2: Solapamiento espectral necesario para que ocurra transferencia de energía radiativamente.

(ii) *Transferencia de energía no radiativa:* ocurre solamente si existe alguna interacción entre Sens* y A, y si el espectro de emisión de Sens* se solapa con el espectro de absorción de A, de modo tal que las transiciones vibracionales en ambas moléculas tienen prácticamente la misma energía. Es decir que dichas transiciones están acopladas. La transferencia de energía puede producirse por mecanismos de interacción coulombica y/o por solapamiento de orbitales moleculares. Las interacciones coulombicas (Figura 1.3a) pueden ser dipolo-dipolo de largo alcance (tipo Förster) o de multipolos de corto alcance. Por el contrario, las interacciones de orbitales moleculares siempre son de corto alcance y pueden involucrar intercambio de energía de resonancia o de electrones.

Hay que tener en cuenta, que para transiciones permitidas (singlete-singlete o triplete-triplete) las interacciones predominantes son las coulombicas, aún a corta distancia. Sin embargo, para transiciones prohibidas (transferencia de energía entre estado de diferente multiplicidad) la interacción coulombica es despreciable y el intercambio de electrones o energía de resonancia predominan, y ocurren sólo a cortas distancias.⁸

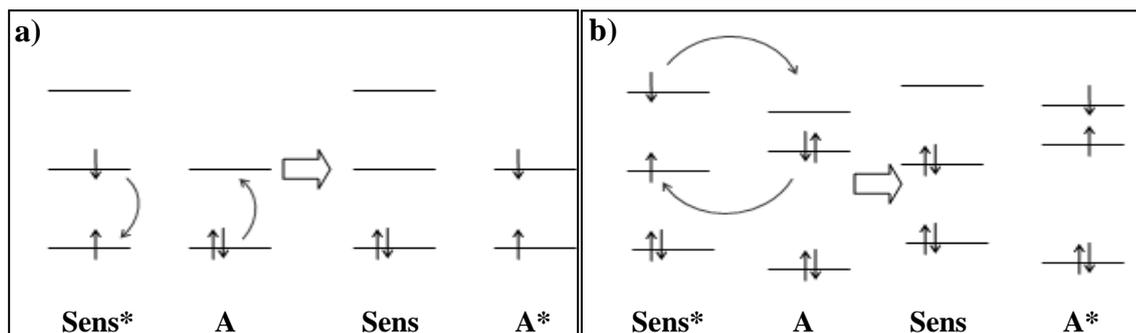


Figura 1.3: Diagrama de niveles de energía en el que se muestran la transferencia de electrones en procesos de transferencia de energía no radiativa por: a) mecanismo dipolo-dipolo o coulombico (tipo Förster) y b) mecanismo de intercambio de electrones (tipo Dexter).

La transferencia de energía triplete-triplete es el tipo más frecuente y más importante en fotoquímica orgánica, ya que es utilizado comúnmente para generar estados excitados tripletes de moléculas con bajos rendimientos cuánticos de producción de este tipo de estados excitados. Es decir, existen compuestos que no pueden generar estados tripletes por absorción directa de radiación pero que pueden generarlo a través de un proceso de transferencia de energía. Más aún, la química de los tripletes puede ser muy diferente a la de los singletes excitados. Por lo tanto, como se dijo anteriormente, para un dado compuesto mediante procesos fotosensibilizados se pueden provocar reacciones diferentes a las obtenidas a partir de la absorción de radiación por el mismo. La eficiencia del proceso de transferencia de energía depende de las configuraciones de *spin* y de la energía relativa de los estados excitados del dador y del aceptor. Un caso importante de transferencia de energía triplete-triplete es la excitación fotosensibilizada del O₂ para genera oxígeno singlete. Esta especie que tiene un rol fundamental en los procesos fotoquímicos se presenta detalladamente en la Sección 1.5.

1.3.2 Transferencia de electrones

Las moléculas en estado electrónico excitado sufren cambios en sus propiedades físicoquímicas respecto del estado basal, en particular, su acidez y potencial redox. Estas moléculas son fuertemente oxidantes o reductoras.⁹ Cuando una especie química se oxida o reduce, por reacción con otra especie electrónicamente excitada por absorción de radiación electromagnética, se dice que la transferencia de electrones es fotosensibilizada.

La transferencia de electrones consiste en una reacción en la cual un electrón es cedido (o aceptado) por una molécula excitada hacia (o desde) un aceptor en su estado

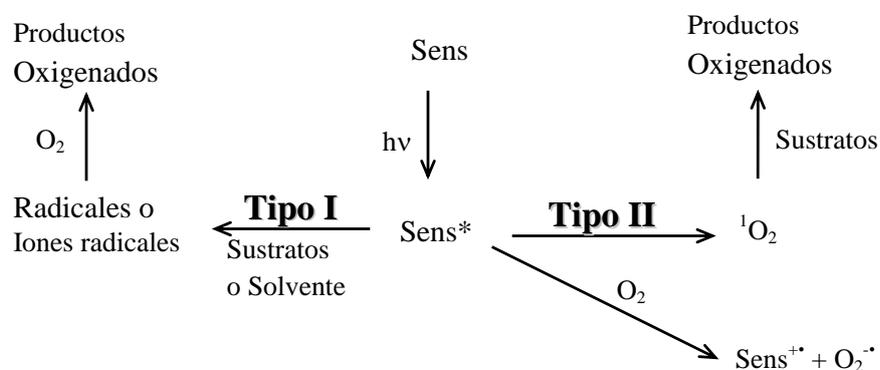
fundamental, de acuerdo con los respectivos potenciales redox de los dos estados involucrados. Si la transferencia de electrones se produce entre dos moléculas sin carga se produce un par de iones radicales. La molécula electrónicamente excitada puede ser tanto de tipo “dadora” (Reacción 9) como “aceptora” (Reacción 10) de electrones:



1.4 Oxidaciones fotosensibilizadas

Las fotooxidaciones son un conjunto de procesos fotoinducidos de gran importancia en sistemas biológicos, en los cuales se produce la oxidación de una molécula blanco.² Si, además, la fotooxidación ocurre en una molécula como resultado de la absorción de radiación por otra (sensibilizador), el proceso es una oxidación fotosensibilizada. Estos procesos pueden ocurrir a través de un conjunto de mecanismos que involucran tanto fenómenos de transferencia de energía como de electrones (Sección 1.3). El oxígeno involucrado en las oxidaciones puede estar en su estado triplete basal o en un estado singlete excitado.⁹

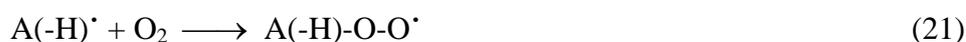
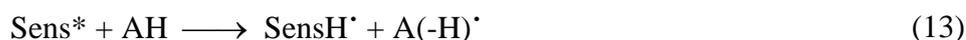
En este trabajo usaremos la clasificación de mecanismos de oxidaciones fotosensibilizadas realizada por Foote.¹⁰ El primer paso, como en todo proceso fotosensibilizado, implica la absorción de la radiación por un sensibilizador (Sens) generando, de esta manera, un estado excitado del sensibilizador (Sens*), que puede ser un estado singlete o triplete. El sensibilizador electrónicamente excitado puede reaccionar con el sustrato o el solvente (mecanismo Tipo I) o con el O₂ (mecanismo Tipo II) (Esquema 1.2.).



Esquema 1.2: Oxidaciones fotosensibilizadas de Tipo I y de Tipo II¹³

1.4.1 Mecanismos Tipo I

En los mecanismos Tipo I el sensibilizador excitado reacciona con el sustrato o el solvente, a través de un proceso de abstracción de un electrón (Reacciones 11-12) o de un átomo de hidrógeno (Reacciones 13-14), generando radicales. Estos radicales reaccionan con el oxígeno molecular disuelto en el medio para producir productos oxigenados (Reacciones 16-21).



Esquema 1.3: Reacciones que pueden ocurrir en fotooxidaciones de Tipo I.

1.4.2 Mecanismos Tipo II

Los mecanismos de Tipo II generan, fundamentalmente, oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) por transferencia de energía (Sección 1.5). Sin embargo, también puede ocurrir la transferencia de electrones desde el sensibilizador excitado, generando anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Esta especie reactiva puede oxidar a un sustrato, al igual que en la Reacción 17 del Esquema 1.3 (mecanismos Tipo I), siendo el resultado final exactamente el mismo (por ello, el papel del $\text{O}_2^{\bullet-}$ no siempre puede asignarse a un mecanismo Tipo I o Tipo II, indiscutiblemente).

1.5 Oxígeno singlete

Dada la importancia del $^1\text{O}_2$ para este trabajo de tesis, sus propiedades generales, sus mecanismos de generación junto con las reacciones más importantes serán discutidas en esta sección.

1.5.1 Estados excitados del oxígeno

El oxígeno es el elemento más abundante sobre la corteza terrestre, principalmente en su forma de molécula biatómica (O_2) gaseosa, constituyendo el 21 % en volumen del aire seco. Por ello su presencia es casi inevitable en cualquier sistema de reacción.¹¹ Su alto contenido energético, su gran reactividad y sus estados excitados, de energía relativamente baja, hacen al O_2 una especie muy importante desde el punto de vista fotoquímico.

Para entender la reactividad química del O_2 es necesario conocer su estructura electrónica. Con la teoría de orbitales moleculares se puede construir un diagrama para su estado fundamental, que posee 16 electrones. La configuración resultante es $(\sigma_{1s})^2 (\sigma^*_{1s})^2 (\sigma_{2s})^2 (\sigma^*_{2s})^2 (\sigma_{2p})^2 (\pi_{2p})^4 (\pi^*_{2p})^2$. Esto da tres estados electrónicos correspondientes a tres arreglos posibles para los electrones.

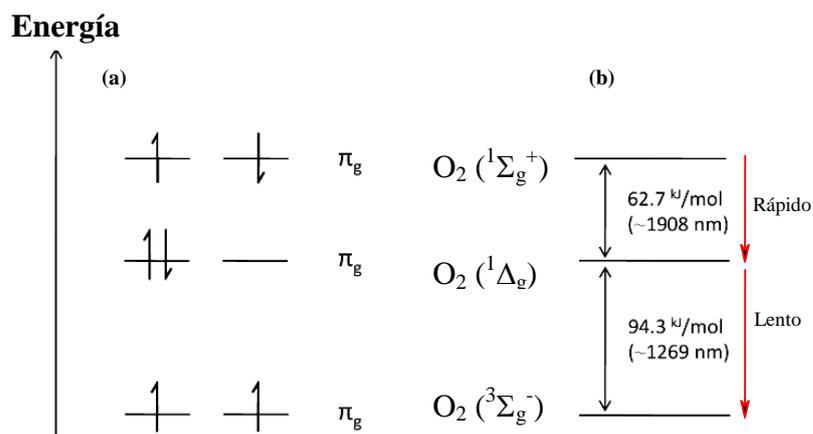


Figura 1.4: a) Representación de los orbitales moleculares (OM) de mayor energía electrónicamente ocupados (HOMO) del O_2 . b) Diagrama de energía en fase gaseosa para el O_2 .¹² Las flechas rojas indican las vías de desactivación posibles.

El estado fundamental del O_2 es un triplete $O_2(^3\Sigma_g^-)$, paramagnético, debido a sus dos electrones no apareados. Los dos estados excitados energéticamente más próximos son singletes, cuyas notaciones espectroscópicas son $^1\Delta_g$ y $^1\Sigma_g^+$. En la Figura 1.4 puede apreciarse el diagrama de energía para el O_2 . De los dos estados excitados mencionados sólo el de menor energía $O_2(^1\Delta_g)$ parece jugar un papel significativo en reacciones en solución y es a éste estado al que se lo denomina comúnmente oxígeno singlete 1O_2 . El mismo se encuentra a $94,3 \text{ kJ/mol}$ sobre el estado basal. El estado excitado de mayor

energía $O_2(^1\Sigma_g^+)$, por su parte, se desactiva rápidamente al $^1\Delta_g$ disminuyendo así las chances de participar en todo tipo de reacciones.¹³

1.5.2 Formación de oxígeno singlete

Típicamente, el 1O_2 puede generarse tanto a través de reacciones químicas como mediante métodos fotoquímicos. Las primeras involucran reacciones químicas en las cuales uno de los productos es el O_2 electrónicamente excitado (es decir, 1O_2). En este sentido, uno de los ejemplos mejor conocidos está dado por la reacción del hipoclorito de sodio ($NaClO$) con agua oxigenada (H_2O_2). También se ha demostrado que, durante la oxidación del $O_2^{\cdot\cdot}$ *in vivo*, se producen 1O_2 .

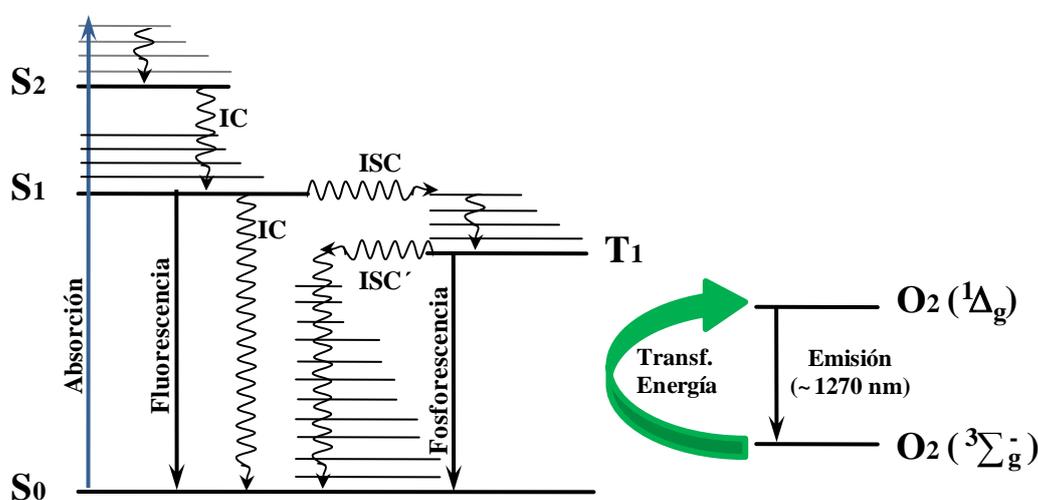
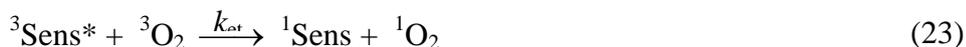


Figura 1.5: Diagrama de Jablonski modificado que representa la producción fotosensibilizada de oxígeno singlete. Luego del proceso de conversión interna (IC) que conduce a la formación del estado S_1 , un buen fotosensibilizador puede eficientemente poblar el estado triplete (T_1) por ISC. Como consecuencia de la colisión bimolecular entre T_1 y oxígeno en su estado fundamental $O_2(^3\Sigma_g^-)$ se produce, por transferencia de energía, $O_2(^1\Delta_g)$.

Tal como se esquematiza en la Figura 1.5, la generación fotoquímica consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada, en estado triplete, al O_2 . Como consecuencia de esta transferencia se regenera el sensibilizador en su estado basal y el O_2 queda en su estado excitado singlete (Reacción 23). En general, cuando el sensibilizador es una molécula orgánica, la absorción de radiación electromagnética genera un estado excitado singlete, que mediante cruzamiento intersistemas (ISC), genera cierta proporción de moléculas en estado triplete de mayor tiempo de vida (Reacción 22). Es este estado triplete del sensibilizador el que tiene la capacidad de transferir su energía al oxígeno molecular (3O_2) disuelto en el medio (Reacción 23).



Muchos compuestos presentes en los seres vivos son capaces de generar ${}^1\text{O}_2$ fotoquímicamente (reacciones 22 y 23), entre los que se encuentran heterociclos muy conocidos como las porfirinas y las flavinas; como así también varios derivados pteridínicos. Además estas moléculas pueden ser excitadas mediante luz visible y radiación UV del tipo UV-A o UV-B; es decir, que pueden excitarse por exposición a la luz solar. En consecuencia, pueden ocurrir *in vivo* procesos de fotosensibilización en los cuales se genere ${}^1\text{O}_2$ y, por consiguiente, distintas biomoléculas resulten oxidadas.

1.5.3 Desactivación del oxígeno singlete

El ${}^1\text{O}_2$ puede desactivarse por los tres procesos fotofísicos explicados en la Sección 1.1: en forma *no radiativa*, por transferencia de energía al solvente (Reacción 24), en forma *radiativa*, emitiendo radiación en el infrarrojo (Reacción 25) o mediante un proceso de desactivación transfiriendo su exceso de energía a otro compuesto (Q) que esté presente en el medio (Reacción 26).

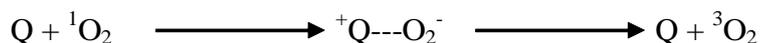


En general, la velocidad de la vía de desactivación radiativa es mucho menor que la no radiativa ($k_d \gg k_e$). Sin embargo, la eficiencia de la desactivación por transferencia de energía al solvente es fuertemente dependiente de las características vibracionales del mismo. Los solventes con frecuencias vibracionales altas provocan una más eficiente relajación y el tiempo de vida del ${}^1\text{O}_2$ (τ_Δ) en ellos es muy corto. El agua posee una fuerte vibración O-H próxima a 3600 cm^{-1} , por esta razón, el ${}^1\text{O}_2$ presenta un tiempo de vida mucho menor en medio acuoso (3 a $4 \mu\text{s}$)¹³ que en otros solventes. El reemplazo de agua común por agua deuterada (D_2O) disminuye la velocidad de desactivación del estado

singlete aproximadamente un orden de magnitud debido a que las frecuencias vibracionales disminuyen ($62 \mu\text{s}$).¹⁴

Dado que los sistemas biológicos son sistemas acuosos, el tiempo de vida media del $^1\text{O}_2$ en ellos es relativamente corto. Además es probable que sea aún menor debido a la desactivación por los componentes de los sistemas biológicos. Puede esperarse que sobre las membranas (de composición mayoritariamente lipídica) el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ sea más largo, como se observa en solventes orgánicos.

El proceso de desactivación física (Reacción 26) puede ocurrir principalmente por dos mecanismos: transferencia de energía y transferencia de carga. El primer mecanismo es exactamente el camino inverso a la producción fotosensibilizada de $^1\text{O}_2$, y ocurre fácilmente si está presente una molécula cuya energía de excitación al triplete sea menor que la del O_2 . Un ejemplo de éste mecanismo puede observarse en presencia de carotenos, que tienen un papel muy importante protegiendo de daño foto-oxidativo a los sistemas fotosintéticos. El segundo mecanismo ocurre en presencia de moléculas ricas en electrones. El proceso parece ocurrir por una transferencia de cargas parcial:



El $^1\text{O}_2$ puede también reaccionar con un compuesto presente en el medio, hablándose en este caso de una desactivación química (Reacción 27). En la sección siguiente se describirán algunas reacciones frecuentes en las que participa el $^1\text{O}_2$.

1.5.4 Reacciones del oxígeno singlete

El $^1\text{O}_2$ es una especie electrofílica sumamente reactiva y tiene la capacidad de atacar rápidamente a los compuestos orgánicos. Esta mayor reactividad se debe en parte a que numerosas sustancias con las que reacciona se encuentran en estado fundamental singlete, entonces la reacción es singlete-singlete, más probable que una reacción triplete-singlete, como debería ser con el O_2 en su estado basal.

Existe una gran variedad de reacciones entre las cuales pueden destacarse las siguientes: cicloadiciones [4+2] con 1,3-dienos para formar endoperóxidos, cicloadiciones [2+2] con compuestos que presentan dobles enlaces aislados para formar los correspondientes dioxoetanos y otro tipo de ataque a dobles enlaces aislados en los cuales se generan hidroperóxidos (Figura 1.6). En todas estas reacciones los productos primarios formados pueden sufrir reordenamientos para dar una amplia gama de productos oxidados

estables. El $^1\text{O}_2$ reacciona con macromoléculas de fundamental importancia para los seres vivos.¹⁵ En el próximo capítulo se explicarán con mayor detalle las reacciones del $^1\text{O}_2$ con el ADN y sus componentes. A nivel celular esta especie reactiva afecta estructuras subcelulares y puede provocar la muerte.^{16,17,18}

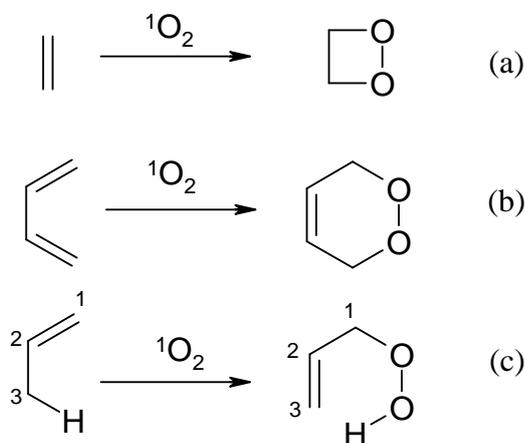


Figura 1.6: Fotooxidaciones mediadas por $^1\text{O}_2$: (a) cicloadición [2+2], (b) ciclo adición [2+4], (c) adición 1,3-eno.

1.6 Referencias

- 1 J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edition, Springer (2006)
- 2 S. Braslavsky, *Glossary of Terms Used in Photochemistry*, 3rd Edition, *Pure Appl. Chem.* 79, 293–465 (2007)
- 3 A. Gilbert, J. Baggott, *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Science (1991)
- 4 N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books (1991)
- 5 J. C. Scaiano, *Handbook of Organic Photochemistry*, CRC Press (1989)
- 6 C. E. Wayne, R. P. Wayne, *Photochemistry*, Oxford Science Publications N°. 39 (1996)
- 7 A. M. Braun, M. –T. Maurette, E. Oliveros, *Photochemical Technology* (translated by D. Ollis and N Serpone) Wiley (1991)
- 8, B. Valeur, *Molecular fluorescence*, Wiley (2001)
- 9 P. Klan, J. Wirz, *Photochemistry of Organic Compounds*, Wiley (2009)
- 10 C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 54, 659
- 11 C. S. Foote, J. S. Valentine, A. Greenberg, J. F. Liebman, *Active oxygen in chemistry*, Blackie A & P (1995)
- 12 D.B. Min, J.M. Boff, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **2002**, 1, 58–72
- 13 C. S. Foote, E. L. Clennan, *Properties and reactions of singlet dioxygen*, in: C. S. Foote, J. S. Valentine, A. Greenberg, J. F. Liebman (Eds.), *Active Oxygen in Chemistry*, Chalmers & Hall, Vol. 2, Chapt. 4 (1995)
- 14 L. A. Martinez, C. G. Martinez, B. B. Klopotek, J. Lang, A. Neuner, A. M. Braun, E. Oliveros, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2000**, 58, 94–107
- 15 R. Nilsson, P. B. Merkel, D. R. Kearns, *Photochem. Photobiol.*, **1972**, 16, 117–124
- 16 R. Y. Stanier, E. A. Adelberg, J. L. Ingraham, *Microbiología*, 4ta Ed., Reverté, (1984)
- 17 B. W. Henderson, T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.*, **1992**, 55, 145–157
- 18 R. C. Straight, J. D. Spikes, *Singlet O₂*, Vol. IV, CRC Press, 85, (1985)

Capítulo 2

Fotosensibilización de biomoléculas

Este capítulo pretende exponer brevemente los diferentes fenómenos o procesos desencadenados por la radiación que, potencialmente, tienen lugar en los sistemas vivos. En este sentido, en primer lugar se describirán las características, en términos energéticos, de la radiación solar que incide sobre la superficie terrestre, haciendo hincapié en la radiación UV-visible. A continuación, se describirá detalladamente la composición química de una de las biomoléculas de mayor relevancia en los sistemas biológicos (el ácido desoxirribonucleico o ADN y sus componentes monoméricos, los nucleótidos). Por último, se describirán y esquematizarán las principales reacciones, como así también los mecanismos de reacción, en los que participan estas biomoléculas, cuando son expuestas a la radiación UV-visible.

2.1 Radiación UV proveniente del sol que alcanza la superficie terrestre

El espectro completo de radiación solar es muy amplio y abarca radiaciones que van desde los rayos gama (< 10 pm) hasta las ondas de radiofrecuencia (> 10 km).¹ Sin embargo, sólo una porción de la radiación emitida por este cuerpo celeste alcanza la superficie terrestre. Este fenómeno se debe a la presencia de partículas y/o moléculas, que se interponen entre el sol y la Tierra, capaces de absorber parte de esta radiación.

El tipo de radiación solar o espectro que llega a la superficie terrestre depende de numerosos factores, tales como, la localización geográfica, la altitud, la estación del año, la hora del día y el espesor de la capa de ozono. Por lo tanto, las características de la radiación en la superficie terrestre no son idénticas en cada punto del planeta. En la Figura 2.1, se muestra como ejemplo un espectro registrado al mediodía en una ciudad Sudafricana a 30° latitud Sur. Del total de la energía solar que alcanza la superficie terrestre, un 15 % pertenece a radiación ultravioleta (UV) (200-400 nm), un 60 % a la radiación visible (400-700 nm) y el 25 % remanente a radiación infrarroja.¹

Ciertamente, la radiación UV no representa el tipo mayoritario de radiación solar incidente sobre la superficie terrestre. Sin embargo, por ser la radiación más energética (esto es, con longitudes de onda más cortas) es, potencialmente, la más nociva para los diferentes sistemas biológicos. Tal como se esquematiza en la Figura 2.1, la radiación UV se divide en tres regiones de acuerdo al efecto biológico resultante:

(i) *Región UV-C*: comprende las longitudes de onda que van desde los 200 nm hasta alrededor de 280 nm. Esta región del espectro solar es absorbida, principalmente, por el ozono (O_3) presente en la atmósfera (capa de O_3) y por lo tanto no alcanza la superficie terrestre.²

(ii) *Región UV-B*: se extiende, aproximadamente, desde los 280 nm hasta alrededor de los 320 nm. Ciertamente, una porción importante de esta zona del espectro no alcanza la superficie de la Tierra por ser absorbida parcialmente por O_3 . La longitud de onda más corta detectable a nivel del mar es aproximadamente 290 nm. Sin embargo, ese punto de corte es altamente dependiente de la concentración de O_3 atmosférico y una disminución de la capa del mismo permite el ingreso de radiación de longitudes de onda más cortas al ambiente terrestre.

(iii) *Región UV-A*: abarca la zona del espectro electromagnético comprendida entre los 320 nm y los 400 nm. Como puede apreciarse en la Figura 2.1, la radiación UV-A constituye la mayor parte de la radiación solar UV que alcanza la superficie terrestre. Además atraviesa más fácilmente nubes y ventanas de vidrio (el punto de corte del vidrio es aproximadamente 320 nm).

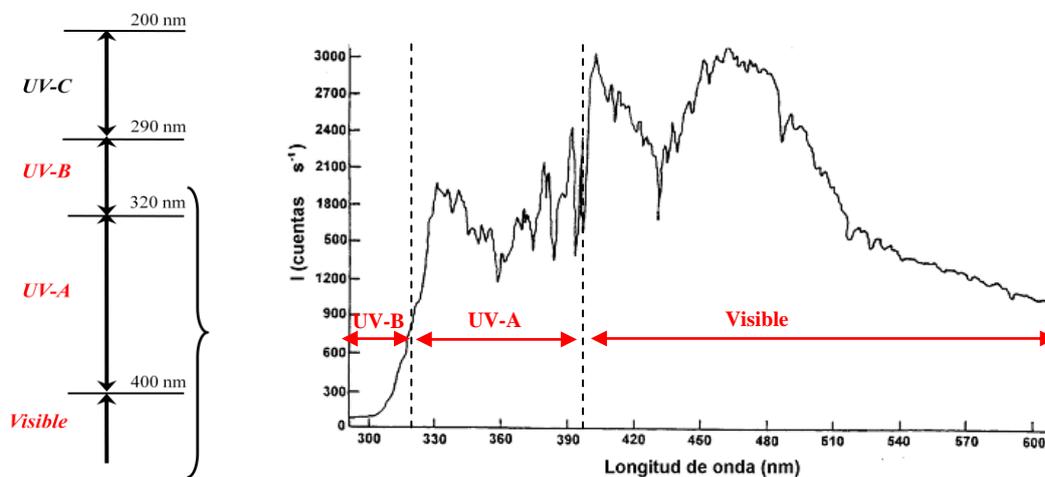


Figura 2.1 Espectro de radiación solar (Adaptado de la referencia 2)²

2.2 Bases nitrogenadas, nucleósidos y nucleótidos

Los nucleótidos, son un grupo de compuestos heterocíclicos presentes en todos los sistemas biológicos y son esenciales para la vida. Por un lado, representan la estructura química/molecular a través de la cual se almacena la información genética de los sistemas vivos, dado que son los constituyentes primarios del ácido desoxirribonucleico (ADN).

Asimismo, participan de diversas funciones en el metabolismo celular: son moléculas ricas en energía que dirigen los procesos metabólicos de las células, actúan como señales químicas y son componentes estructurales de ciertas enzimas e intermediarios metabólicos.

2.2.1 Estructura química

Los nucleótidos son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de una base nitrogenada, un monosacárido de cinco carbonos y uno o más grupos fosfatos (Figura 2.2). Los nucleótidos se clasifican según el tipo de monosacárido en dos grandes: los *ribonucleótidos*, en los cuales el azúcar es la ribosa, y los *desoxirribonucleótidos*, donde el azúcar es la 2'-desoxirribosa (Esquema 2.1, columna (a)). El prefijo *desoxi* significa que este azúcar carece de un átomo de oxígeno, en la posición 2', respecto de la ribosa.

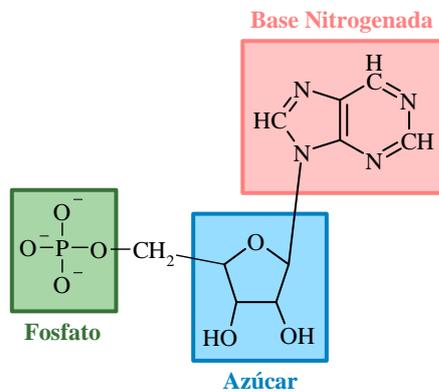
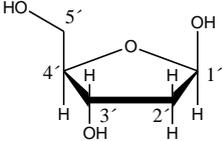
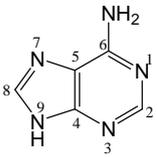
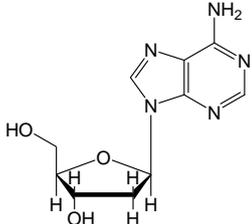
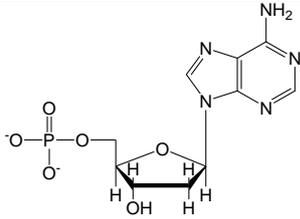
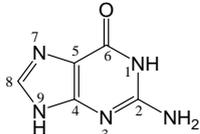
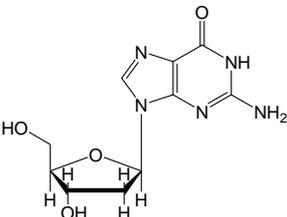
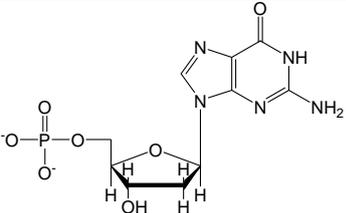
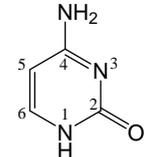
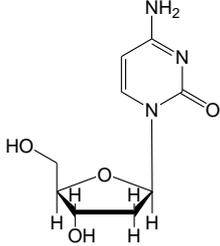
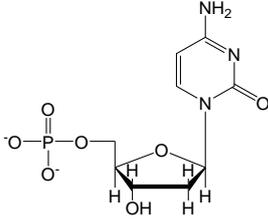
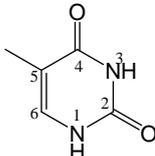
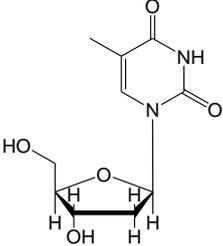
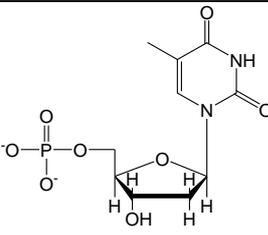


Figura 2.2: Estructura química de un nucleótido.

La base nitrogenada de los desoxirribonucleótidos puede ser una purina o una pirimidina. Las estructuras químicas de estos compuestos, junto con sus nomenclaturas abreviadas, pueden apreciarse en la columna (b) del Esquema 2.1.

En un desoxirribonucleótido el átomo de carbono ubicado en la posición 1', C(1'), de la desoxirribosa se enlaza con el N(1) de las pirimidinas o con el N(9) de las purinas, formando un enlace N-glicosídico β. El signo prima (') se usa para diferenciar posiciones sobre el azúcar de posiciones sobre las bases. Una base unida a la desoxirribosa es un nucleósido (Esquema 2.1, columna (c)), mientras que al derivado éster fosfórico de un nucleósido se lo denomina nucleótido. La posición más frecuente de la unión éster en los nucleótidos naturales es el grupo hidroxilo del C (5') del azúcar. Este compuesto se denomina nucleósido 5'-fosfato o 5'-nucleótido. En la columna (d) del Esquema 2.1 se

muestran las estructuras químicas de los nucleótidos presentes en el ADN, junto a su nomenclatura.

(a) Desoxirribosa	(b) Bases	(c) Nucleósidos	(d) 5'-Nucleótidos
 <p>2'-desoxirribosa</p>	 <p>Adenina (A)</p>	 <p>2'-desoxyadenosina (dA)</p>	 <p>2'-desoxyadenosina 5'-monofosfato (dAMP)</p>
	 <p>Guanina (G)</p>	 <p>2'-desoxiguanosina (dG)</p>	 <p>2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP)</p>
	 <p>Citosina (C)</p>	 <p>2'-desoxicitosina (dC)</p>	 <p>2'-desoxicitosina 5'-monofosfato (dCMP)</p>
	 <p>Timina (T)</p>	 <p>2'-desoxitimidina (dT)</p>	 <p>2'-desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP)</p>

Esquema 2.1: Estructura química de los componentes del ácido desoxirribonucleico (ADN). (a) Desoxirribosa. (b) bases nitrogenadas (púricas y pirimídicas) que forman parte de los nucleótidos. (c) Nucleósidos y (d) Nucleótidos presentes en el ADN.

2.2.2 Equilibrios ácido-base

Los nucleótidos purínicos 5'-monofosfato son especies químicas que, en medio acuoso, poseen diversos grupos ionizables ubicados tanto en el grupo fosfato, como así también en la base nitrogenada. Por consiguiente, en este tipo de solventes, la carga neta de estas moléculas dependerá del valor de pH del medio. En la Tabla 2.1 se listan los valores de los pK_a correspondientes a un desoxirribonucleótido (dGMP) y dos ribonucleótidos (GMP y AMP).

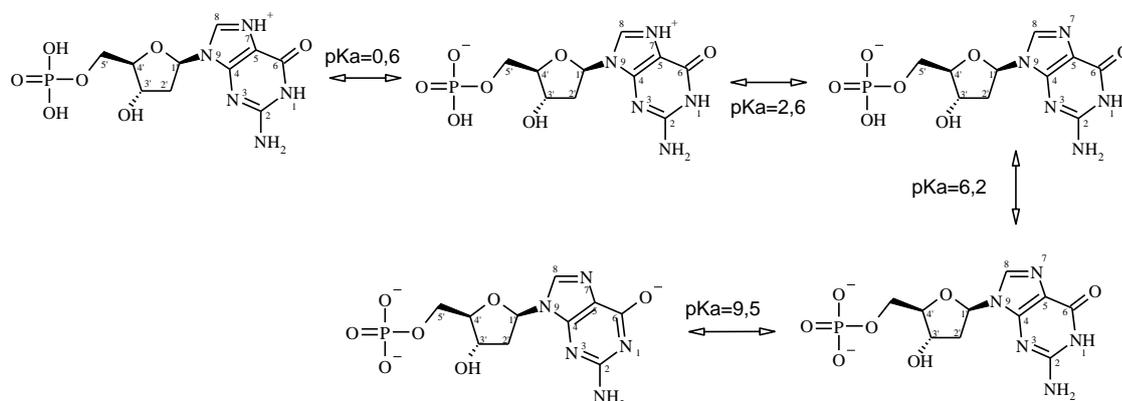
	dGMP	GMP		AMP
$pK_{a1}^{(PO_3H_2)}$	$0,6 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,2$	$pK_{a1}^{(PO_3H_2)}$	$0,4 \pm 0,2$
$pK_a^{N(7)}$	$2,69 \pm 0,03$	$2,48 \pm 0,04$	$pK_a^{N(1)}$	$3,84 \pm 0,02$
$pK_{a2}^{(PO_3H_2)}$	$6,29 \pm 0,01$	$6,25 \pm 0,02$	$pK_{a2}^{(PO_3H_2)}$	$6,22 \pm 0,01$
$pK_a^{N(1)}$	$9,56 \pm 0,02$	$9,49 \pm 0,02$		

Tabla 2.1: Valores de pK_a correspondientes a los equilibrios ácido-base que presentan nucleótidos constituidos por bases purínicas, en solución acuosa.^{3,4}

Nótese que en los nucleótidos con guanina como base, dGMP y GMP, el equilibrio ácido-base involucra al átomo de nitrógeno ubicado en la posición 7, N(7), lo cual implica la protonación de la purina; mientras que el correspondiente a N(1) consiste en una deprotonación con la consiguiente generación de una carga negativa neta localizada en el átomo de O unido al C(6). Estos equilibrios se muestran para dGMP en el Esquema 2.2. Asimismo, puede observarse en la Tabla 2.1 que los valores de pK_a entre dGMP y GMP son similares, por lo tanto la presencia de un sustituyente OH en la posición 2' de la ribosa, no afecta los equilibrios ácido-base de este tipo de biomoléculas.

La única porción de los nucleótidos que absorbe radiación electromagnética por encima de 200 nm es la base nitrogenada. Las transiciones entre estados electrónicos de las purinas y las pirimidinas ocasionan la absorción de radiación entre 200 y 300 nm, con máximos alrededor de 260 nm. Es decir, los nucleótidos absorben principalmente radiación UV-C y en menor medida UV-B (sección 2.1). Como se explicó anteriormente, en condiciones normales, estas radiaciones prácticamente no alcanzan la superficie terrestre debido a que son filtradas, mayormente, por la capa de ozono. Sin embargo, en regiones donde la capa de ozono es más delgada, estas radiaciones pueden llegar a la Tierra y ser

absorbidas directamente por las bases nitrogenadas provocando reacciones químicas que serán explicadas en las próximas secciones.



Esquema 2.2: Equilibrios ácido-base que presenta la molécula de dGMP en solución acuosa, en el intervalo de pH comprendido entre 0 y 14.

2.2.3 Espectros de absorción

En la Figura 2.3 se muestran los espectros de absorción registrados para tres nucleótidos (dGMP, dAMP y dCMP) en solución acuosa. Como es lógico, los equilibrios ácido-base que involucran al grupo fosfato no afectan a los espectros. Sin embargo, si se ioniza la porción cromofórica de la molécula (base nitrogenada), el espectro del nucleótido cambia considerablemente. El único nucleótido que presenta cambios en los espectros de absorción en el rango de pH utilizado, es dGMP que muestra un comportamiento particular. En la Figura 2.3a se aprecia un cambio espectral significativo al variar el pH de la solución. Este hecho pone de manifiesto que el espectro de absorción de la forma aniónica de dGMP es marcadamente diferente al de la correspondiente forma ácida. Por otra parte, tal como se muestra en las Figuras 2.3b y 2.3c, los dos nucleótidos restantes no muestran dependencia alguna del espectro de absorción con el pH (en el intervalo de pH analizado).

Estos resultados se explican sobre la base de lo expuesto en la sección anterior: dGMP es el único nucleótido que presenta un grupo ionizable, ubicado en la base nitrogenada (Tabla 2.1), en el intervalo de pH analizado (*i.e.*, $pK_a^{N(1)}$ de guanina $\sim 9,6$). Por el contrario, tanto dAMP como dCMP, solo presentan equilibrios ácido-base que involucran la protonación o desprotonación del grupo fosfato.

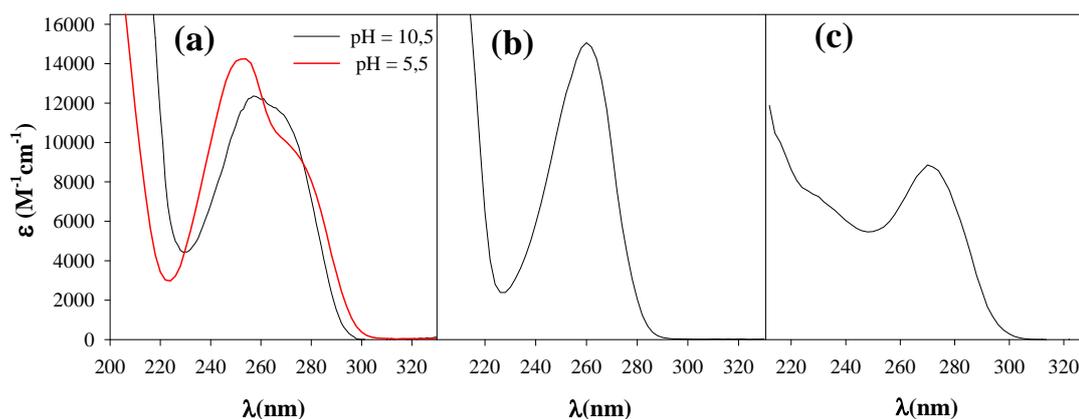


Figura 2.3: Espectros de absorción nucleótidos en solución acuosa, en dos condiciones de pH (i.e., 5,5 y 10,5): a) dGMP, b) dAMP y c) dCMP.

2.3 Ácido desoxirribonucleico

El ácido desoxirribonucleico, o ADN, es un polímero de desoxirribonucleótidos. Esta macromolécula contiene toda la información genética de los seres vivos. La estructura de todas las proteínas de una célula es producto de la información contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN.⁵ Cada molécula de ADN se divide en porciones, los *genes*, que contienen la información para cada proteína.

2.3.1 Estructura química

El ADN está formado por cuatro nucleótidos que se diferencian entre sí sólo por la naturaleza química de la base nitrogenada. En particular, el ADN posee cuatro bases distintas: dos bases púricas (adenina (A) y guanina (G)) y dos bases pirimídicas (citosina (C) y timina (T)). La estructura del ADN fue propuesta por Watson y Crick en 1953⁶, sobre la base de datos de difracción de rayos X obtenidos por Wilkins y Franklin. Esta macromolécula está compuesta por dos cadenas de nucleótidos helicoidales con giro a la derecha que forman una doble hélice alrededor de un eje central. Los nucleótidos sucesivos están unidos covalentemente por uniones/interacciones fosfatos (también llamadas “puentes” de fosfatos). La cadena lineal de ADN tiene una polaridad específica, por lo tanto pueden definirse los extremos 5' y 3'. Esta numeración está referida a la ribosa, en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos hay un grupo fosfato libre unido al C(5') de la ribosa de ese nucleótido, mientras que en el extremo 3' de la secuencia hay un grupo OH unido al C(3') de la ribosa de otro nucleótido. El grupo hidroxilo en 5' de un nucleótido

está unido al grupo hidroxilo en 3' del siguiente nucleótido por un enlace fosfodiéster. Así, los esqueletos covalentes de los ácidos nucleicos consisten en unidades alternativas de grupos fosfatos y residuos de pentosa, mientras que las bases son grupos laterales unidos al esqueleto en intervalos regulares. Ambas cadenas se unen entre sí por puentes de hidrógeno que se establecen entre pares de bases. Las bases se unen entre sí de una sola forma: Guanina se une con Citosina, mientras que Adenina lo hace con Timina. Estas uniones comparten a razón de tres y dos puentes de hidrógeno, respectivamente (Figura 2.4).⁵

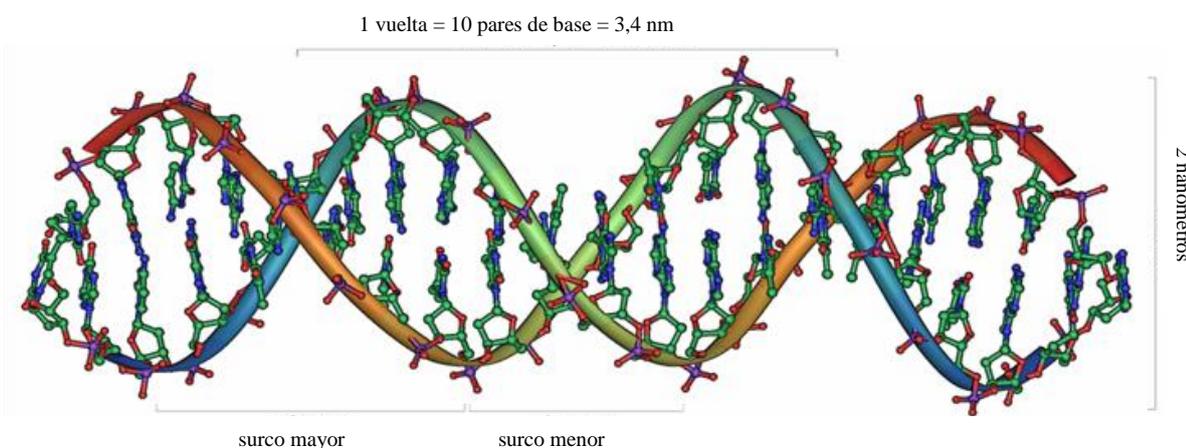


Figura 2.4: Representación esquemática de la estructura secundaria del ADN.

2.4 La radiación y sus implicancias biológicas

La radiación electromagnética, a través de diversos mecanismos que se explicarán en las siguientes secciones, produce modificaciones químicas en la molécula de ADN; las cuales, a su vez, pueden generar una serie de alteraciones a nivel celular.⁷ Si el daño en el material genético de una célula es importante, y no puede ser revertido por los mecanismos de reparación celular, dicha célula indefectiblemente morirá. En términos generales, la muerte celular puede producirse a través de dos mecanismos: *apoptosis* o *necrosis*. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programado que evita el derrame del contenido de la célula, y por lo tanto, no daña el entorno. Por otro lado, la necrosis es la muerte patológica de una célula o tejido. Si el daño en el material genético es menor al necesario para provocar la muerte, las consecuencias para la célula dependerán del tipo y magnitud de las lesiones.

Antes de que una célula se divida, su material genético debe duplicarse. Si el ADN que se utilizará como molde posee alguna base modificada químicamente (por ejemplo,

por exposición a radiación UV) es posible que durante la replicación del ADN se genere una mutación, a pesar de los múltiples sistemas de reparación que poseen las células.⁵ Una mutación es un cambio permanente en la secuencia de bases. Las mutaciones pueden ir desde la sustitución de un par de bases por otro (mutación por sustitución), a la adición o la eliminación de uno o más pares de bases (mutaciones de inserción o deleción). Las mutaciones pueden tener un efecto insignificante en la función de un gen (silenciosas), conferir alguna ventaja a la célula o ser nocivas. Las mutaciones favorables que confieren alguna ventaja a la célula en la que tienen lugar son raras, pero la frecuencia es suficiente para conferir la variación necesaria hacia la selección natural, y por lo tanto, la evolución. No obstante, la mayoría de las mutaciones son desfavorables para las células.⁵

La radiación UV produce mutaciones y a consecuencia de las mismas genera procesos neoplásicos en mamíferos. La carcinogénesis por radiación UV a menudo involucra la inactivación de un gen supresor de tumores (por ejemplo, el gen *p53*) o la sobreexpresión de protooncogenes (entre ellos, el gen *ras*). La función de la proteína *p53* es proteger a la célula del estrés producido por la irradiación UV u otros factores, o producir la apoptosis cuando el daño sobre el ADN es severo. Recientemente, se han detectado formas mutantes de los oncogenes *ras* y en el gen supresor de tumor *p53*, tanto en cánceres de piel en humanos, en zonas expuestas a radiación solar, como en cánceres inducidos por UV-B en ratones.⁸

Por otro lado, los mecanismos de reparación de lesiones en el ADN son más eficientes frente a lesiones originadas por radiación UV-B que UV-A.²⁰ En respuesta a la exposición solar, la piel por un lado se pigmenta (se broncea), y por otro incrementa su espesor. Estos mecanismos de protección le confieren cierta protección a la piel frente a nuevas exposiciones a la radiación UV.⁹ Es por ello que personas de piel muy clara, que no se broncean apreciablemente, tienen mayor riesgo de desarrollar un cáncer de piel.

En el ser humano, los efectos biológicos provocados por la exposición solar están determinados por la naturaleza física de los fotones solares incidentes y la estructura química de los cromóforos presentes en la piel. La piel absorbe mayoritariamente radiación UV-A (más del 95 %) y menos del 2 % de radiación UV-B.¹⁰

2.5 Tipos de mecanismos que participan en el daño al ADN por radiación

Se han realizado numerosos estudios sobre la dependencia de diversos efectos derivados del daño al ADN en función de la longitud de onda (λ) de la radiación incidente.

Por ejemplo, algunos estudios con animales de laboratorio muestran que la luz UV-B es más efectiva en producir cáncer de piel que la UV-A.¹¹ Sin embargo, numerosos estudios recientes han demostrado en las últimas décadas que la radiación UV-A también es mutagénica y carcinogénica.¹²

En la Figura 2.5 se muestra el espectro del ADN superpuesto con distintos espectros de acción, es decir, curvas de diferentes respuestas celulares inducidas por la radiación incidente, en función de λ . En este estudio, para evaluar el efecto producido por las distintas λ sobre el ADN, se analizó la capacidad de inducir mutaciones, producir muerte celular, producir cortes en el ADN y también entrecruzamiento (o *crosslinking*) de ADN con proteínas en células humanas P3.¹¹ En la Figura 2.5 se puede apreciar que el espectro de acción para inducción de mutación y tumorigénesis no coincide con el espectro de ADN en la región UV-A. Este hecho se observó en otros estudios similares realizados sobre otros sistemas biológicos.¹¹

La radiación absorbida por las bases nitrogenadas del ADN (hasta 320 nm aproximadamente) (sección 2.2) produce la respuesta máxima comparada con otras λ , tanto para letalidad, mutagenicidad y *crosslinking*, como para la ruptura del ADN (Figura 2.5). Más aún, los máximos de los espectros de acción se corresponden bastante bien con el máximo del espectro absorción del ADN. Por consiguiente, el efecto de la radiación UV-B y UV-C se explica fácilmente teniendo en cuenta que el ADN absorbe este tipo de radiación y, consecuentemente, sufre fotólisis directa. Sin embargo, λ mayores a 320 nm (radiación UV-A y visible) produjeron las mismas respuestas, aunque con menor eficiencia. Incluso, tanto para mutagenicidad como para ruptura del ADN se observan máximos secundarios en la región UV-A.

Por consiguiente, del análisis de estos experimentos se deduce que existen dos tipos de mecanismos por los cuales el ADN puede ser dañado. Por un lado, la absorción de radiación por las bases genera estados excitados que vuelven reactiva a la molécula de ADN, lo que produce su modificación o alteración química. A este tipo de proceso se lo denomina genéricamente *daño directo*. Por otro lado, la absorción de la radiación incidente por parte de otro cromóforo generará especies químicas que reaccionan con el ADN modificándolo. En este caso se está en presencia de un proceso fotosensibilizado (sección 1.3) y se habla de *daño indirecto* al ADN. Tanto la radiación UV-B como la UV-C puede ser absorbida directamente por el ADN y producir, por lo tanto, daño directo; mientras que

la radiación UV-A y la visible actúan a través de mecanismos indirectos (o fotosensibilización).

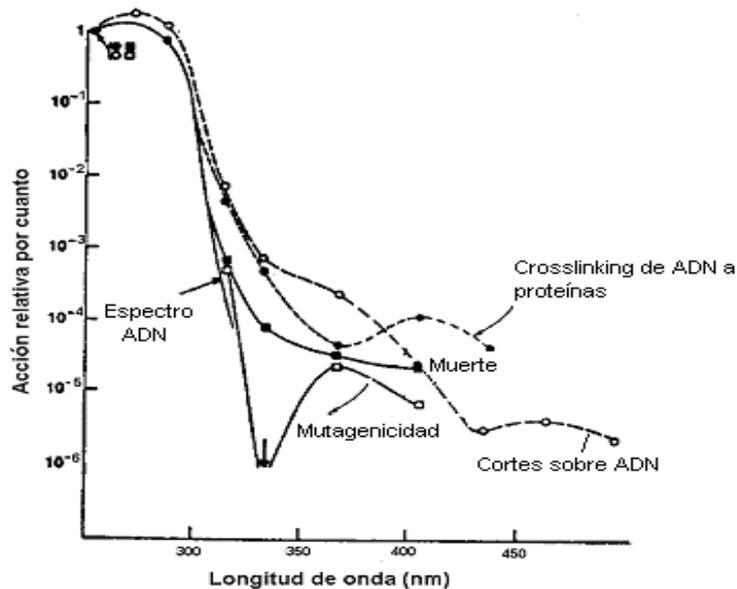


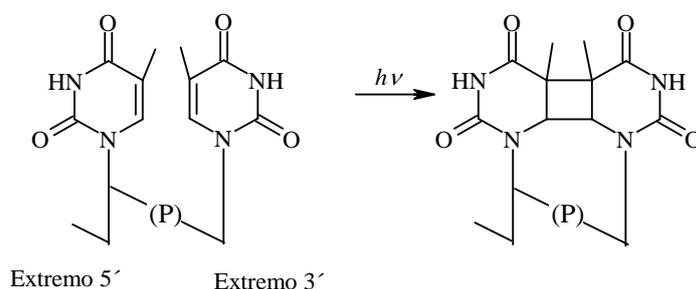
Figura 2.5: Espectros de acción donde se monitorea letalidad, mutagenicidad y otros efectos de la radiación sobre células. Con fines comparativos todos los espectros se normalizaron a 254 nm y se agregó el espectro de absorción del ADN (figura extraída de la referencia).¹¹

2.6 Daño directo al ADN

Los estados excitados generados por absorción directa de radiación producen distintos tipos de reacciones, siendo las más comunes las que involucran a bases pirimídicas. Las bases púricas también sufren reacciones fotoquímicas cuando absorben radiación aunque en menor medida.⁷ Los dos tipos de fotoproductos principales que se generan por irradiación UV-B del ADN, son los denominados, dímeros ciclobutil pirimidinas y los aductos pirimidina(6,4)pirimidona o, simplemente, 6,4-fotoaducto.

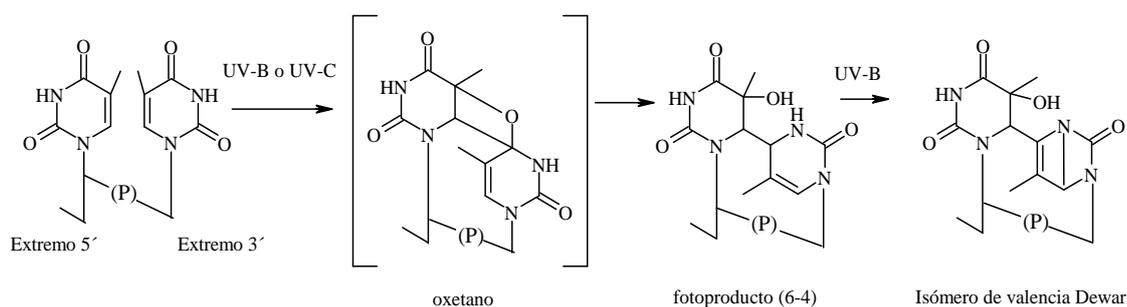
Los dímeros ciclobutil pirimidinas constituyen el fotoproducto más abundante. Se forman por cicloadición [2+2] del doble enlace C(5)-C(6) de bases de pirimidina adyacentes (Esquema 2.3). Pueden encontrarse dímeros T<>T, C<>T, T<>C y C<>C. Si la radiación incidente es de tipo UV-C, el daño puede revertirse por un proceso de monomerización, debido a que los dímeros absorben radiación en esa región del espectro electromagnético. Sin embargo, pueden sufrir también procesos de deaminación, generando así un nuevo producto. Se cree que la formación de dímeros ciclobutil pirimidinas ocurre por fotoexcitación de una pirimidina a un estado singlete, seguido de

entrecruzamiento intersistema y de la posterior reacción de ese triplete con una segunda molécula adyacente en estado fundamental.¹³



Esquema 2.3: Formación de dímeros de timina ciclobutano (T<>T).

En contraste, la formación de aductos pirimidina(6,4)pirimidona involucra reacciones de estados singletes excitados. Son la segunda clase de fotoproductos de pirimidinas más abundantes. Este proceso, a diferencia del anterior, no es reversible. Estos fotoproductos provienen de una cicloadición [2+2] entre el doble enlace del C(5)-C(6) de la pirimidina 5' terminal y del grupo carbonilo C(4) de la timina 3' terminal. Así se genera un oxetano inestable (Esquema 2.4). Si la base 3' es una citosina, se genera un intermediario azetidina a través de una ciclo adición de la función 4-imino de la última base pirimidina. El oxetano o la azetidina pueden reconvertirse espontáneamente dando lugar al aducto pirimidina(6,4)pirimidona. Dado que estos aductos absorben aproximadamente a 320 nm, por irradiación UV-B, fotoisomerizan generando un Isómero de valencia Dewar (Esquema 2.4).⁷



Esquema 2.4: Formación y fotoisomerización del fotoproducto (6,4) de la timina.

Las bases púricas por absorción de radiación UV-B también pueden generar dímeros, entre ellos, dímeros de adenina¹⁴ y aductos adenina-timina.¹⁵ Por otro lado, la

oxidación de guanina por exposición de ADN aislado a UV-B o UV-C también es posible.¹⁶

Las células tienen dos mecanismos principales para defenderse de los dímeros que se producen en el ADN. (i) Uno de ellos consiste en la acción de un elaborado conjunto de enzimas que efectúan la denominada "reparación por corte de nucleótido". Estas enzimas cortan la cadena dañada en la zona donde se encuentran los dímeros de pirimidina, remueven los nucleótidos y vuelven a sintetizar una cadena nueva. (ii) El otro mecanismo se denomina fotorreactivación¹⁷, el cual es realizado por un tipo de enzimas denominadas fotoliasas. Se conocen dos clases de fotoliasas, unas reparan dímeros de pirimidina mientras que otras reparan los fotoproductos (6,4). Las fotoliasas son activadas por la luz azul (350-450 nm) que es absorbida por sus cromóforos. Estas enzimas contienen dos cromóforos, uno de los cuales es siempre flavina adenina dinucleótido (FAD) y el otro puede ser un derivado pterínico (meteniltetrahidrofolato o MTHF) o una deazarriboflavina.¹⁷

2.7 Daños al ADN mediante procesos fotosensibilizados

Como se discutió anteriormente, la radiación no sólo modifica al ADN generando estados excitados de sus bases por absorción directa, sino también a través de procesos fotosensibilizados. Los procesos implicados son variados y muchas veces un sensibilizador actúa simultáneamente a través de varios mecanismos. Pueden distinguirse tres grandes grupos de mecanismos que se describirán a continuación.

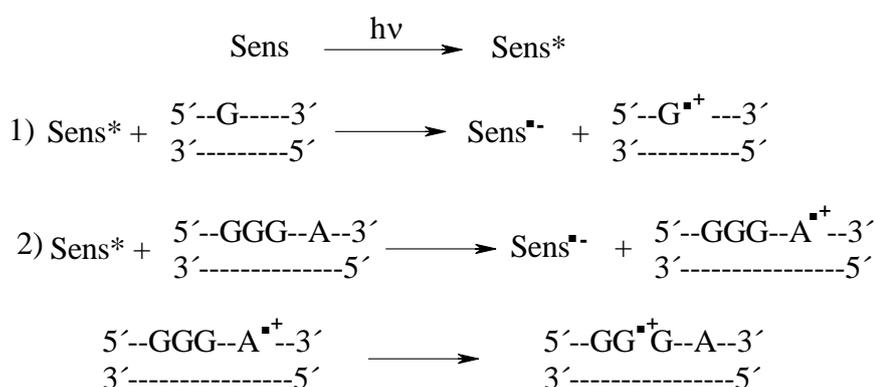
2.7.1 Transferencia de energía de un sensibilizador al ADN

La radiación UV-A induce la formación de dímeros ciclobutil pirimidina en ADN, aunque con menor eficiencia que la UV-B y por un mecanismo diferente. La fotoexcitación UV-A de un fotosensibilizador apropiado (por ejemplo, benzofenona)¹⁸ puede formar estados excitados capaces de participar en reacciones de transferencia de energía triplete-triplete con ciertas bases del ADN, produciendo dímeros ciclobutil pirimidina. Para que este proceso de transferencia de energía tenga lugar, el fotosensibilizador debe estar localizado suficientemente próximo al ADN. En distintos experimentos realizados con bacterias y células eucariotas (particularmente en células de piel)¹⁹, bajo irradiación UV-A, y sin el agregado de fotosensibilizadores exógenos se encontró que los dímeros ciclobutil pirimidina son los productos predominantes del daño fotoinducido por radiación UV-A.²⁰

Los dímeros predominantes son T<>T y no se observa la formación de dímeros pirimidina(6-4)pirimidona. Sin embargo, en experimentos realizados con levaduras se encontró que el mecanismo de transferencia de energía no es el mayoritario. Por el contrario, se encontró una mayor proporción de productos de fotooxidación (ver más adelante). Estos resultados indican que el tipo de célula y su entorno juegan un rol muy importante en los procesos fotoinducidos que afectan al ADN.

2.7.2 Fotooxidaciones Tipo I

Las bases son los sustratos preferenciales dentro del ADN para reacciones de fotooxidación Tipo I (sección 1.4.1). Entre ellas, la guanina, la cual posee el menor potencial de ionización^{21,22} es la más reactiva comparada a adenina, timina, citosina y 5-metil citosina.⁷ El radical catión 2'-desoxiguanosina (dGua^{•+}) generado en el ADN en presencia de un sensibilizador Tipo I, puede provenir de la abstracción inicial de un electrón de un residuo de guanina o a través de una transferencia de hueco (*hole transfer*) desde otra base relativamente lejana. La transferencia de hueco ocurre a través del ADN de doble cadena, principalmente desde cationes radicales adenina hacia la guanina (Esquema 2.5).^{23,24,25} Por lo tanto, la cantidad de radical catión dGua^{•+} producido es mayor que el generado por transferencia de un electrón al sensibilizador y muchísimo mayor a los generados por otras bases.

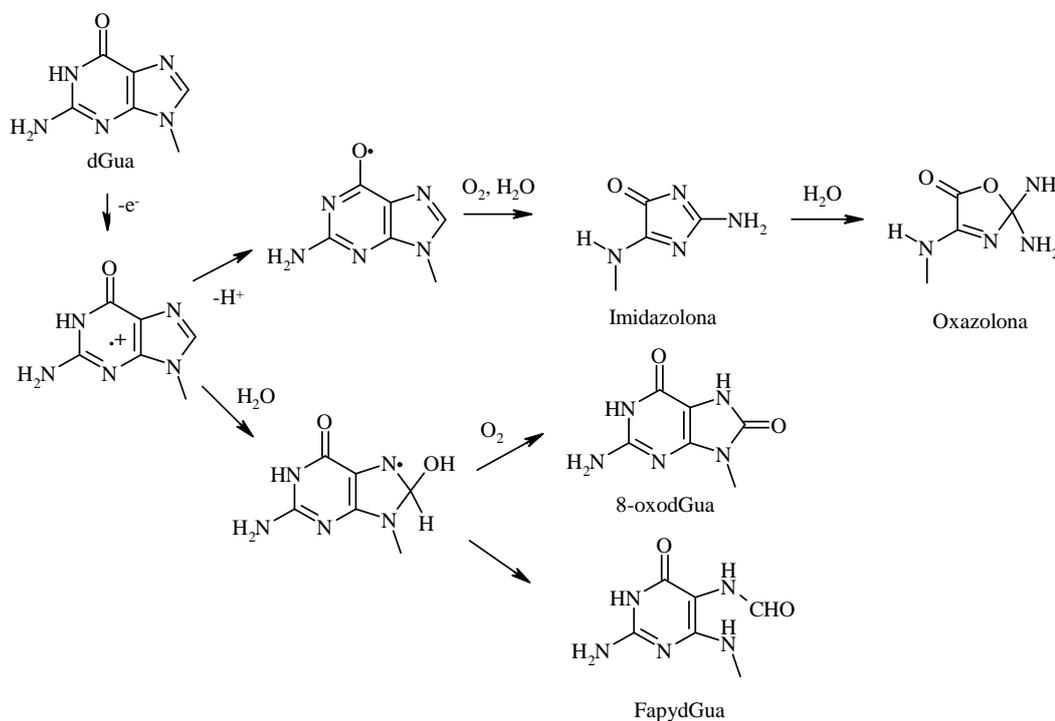


Esquema 2.5: Reacciones de transferencia de electrones en ADN.

El radical catión dGua^{•+} una vez formado puede sufrir hidratación o deprotonación (Esquema 2.6). La hidratación del radical catión dGua^{•+}, da lugar al radical 8-hidroxi-7,8-dihidro 2'-desoxiguanil. Este radical puede participar de dos reacciones competitivas, ser reducido a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapydGua) u oxidado (por O₂)

dando lugar a la formación de 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiguanosina (8-oxodGua). Por otro lado, si el radical catión $\text{dGua}^{+\cdot}$ pierde un protón, genera un radical neutro $\text{dGua}(-\text{H})\cdot$. Esta reacción ocurre rápidamente en soluciones acuosas neutras (con una constante de velocidad de $\sim 2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$) dado que el pK_a del radical catión guanina libre $\text{G}^{+\cdot}$, generado a partir de dGua o de dGMP, es 3,9.²⁶ La reactividad entre $\text{dGMP}(-\text{H})\cdot$ y el O_2 es muy baja ($k < 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)²⁷, mientras que la reactividad entre $\text{dGMP}(-\text{H})\cdot$ y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ es mucho mayor ($k = 1,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).²⁸ Se cree que la baja reactividad de $\text{dGMP}(-\text{H})\cdot$ con el O_2 se debe a su estructura altamente resonante.²⁹

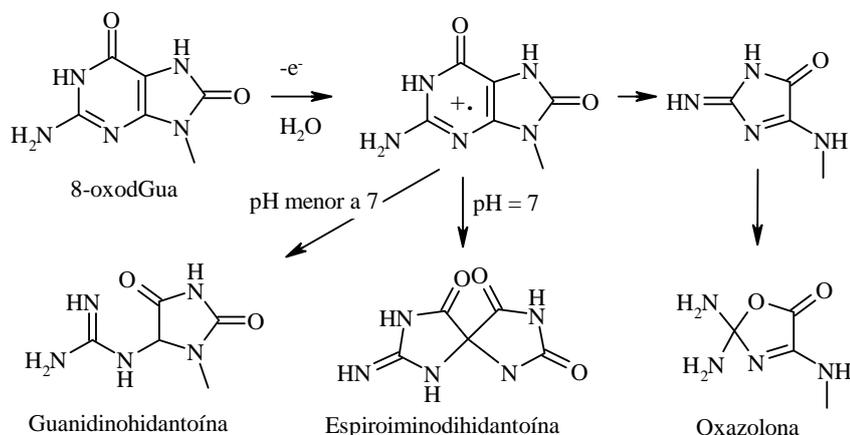
Cuando se provoca la ionización de la G a través de un mecanismo Tipo I, la distribución de productos varía de acuerdo al sustrato utilizado (base libre o fragmento de ADN doble cadena). Cuando se irradia la base libre o fragmentos de ADN simple cadena, la producción de 8-oxodGua es minoritaria.³⁰ Debido al pK_a del catión radical guanina, a pH neutro, la *vía* predominante es la deprotonación y en consecuencia no se detecta 8-oxodGua. Por otro lado, en el ADN doble cadena, la hidratación del catión radical guanina es el proceso predominante, ya que se ve estabilizado por apilamiento y apareamiento de bases, generando mayoritariamente 8-oxodGua y en menor proporción FapydGua.



Esquema 2.6: Productos de degradación de 2'-desoxiguanosina en ADN mediante mecanismo Tipo I.

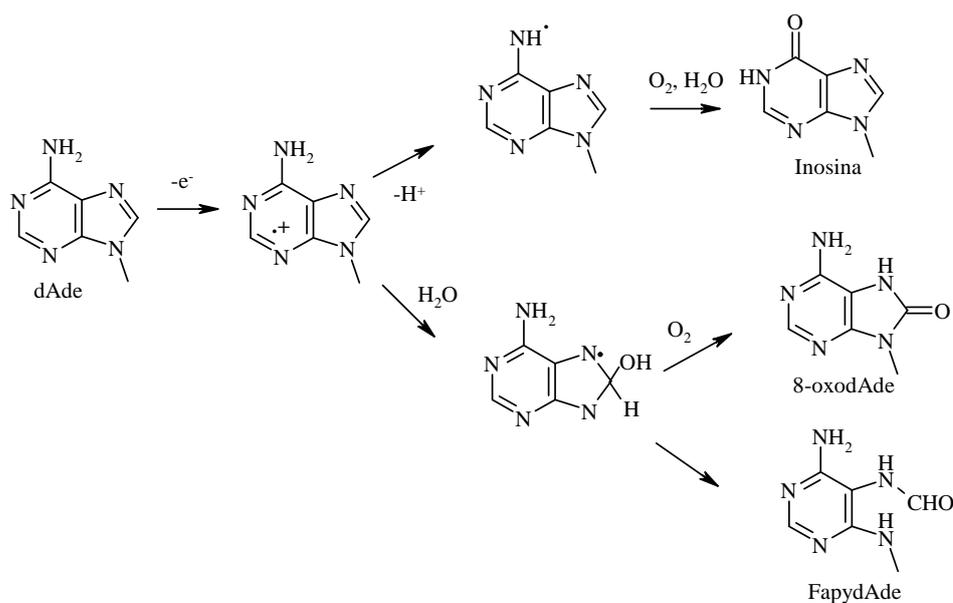
La 8-oxodGua es un marcador bioquímico de estrés oxidativo que puede ser generado por distintos agentes, incluyendo peroxinitrito, radical $\cdot\text{OH}$, oxidantes y $^1\text{O}_2$. Es

un agente genotóxico y si no es reparado conduce a mutaciones.³¹ También es susceptible de sufrir fotooxidaciones Tipo I, generando diversos productos (Esquema 2.7)



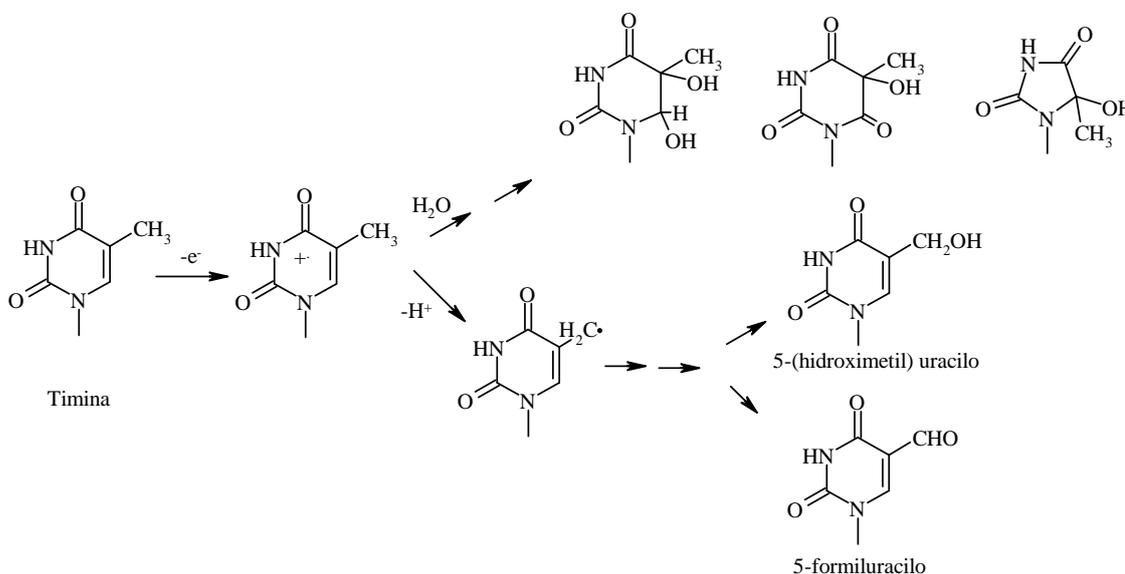
Esquema 2.7: Productos de degradación de 8-oxodGua mediante mecanismo Tipo I.

La adenina a pesar de tener un potencial de ionización mayor que la guanina, también puede ser oxidada a través de un mecanismo Tipo I (Esquema 2.8). El radical catión 2'-desoxiadenosina ($dAde^{+\cdot}$) es preferentemente deprotonado en el grupo amino exocíclico generando, en soluciones acuosas aireadas, 2'-desoxinosina.³² Aunque, en menor medida, la hidratación del radical catión $dAde^{+\cdot}$ también ocurre, produciendo el radical 8-hidroxi-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosil. Este radical es precursor de 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyAde) bajo condiciones reductoras y de 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosina (8-oxoAde) en presencia de O_2 .⁷



Esquema 2.8: Productos de degradación de 2'-desoxiadenosina en ADN mediante mecanismo Tipo I.

En el caso de las bases pirimídicas, las cuales son mucho menos susceptibles a la oxidación que las púricas, el principal camino de descomposición del radical catión pirimidina es la hidratación en posición C(6), tanto para timina como para citosina. Sin embargo, la reacción competitiva (deprotonación) también es posible (Esquema 2.9).⁷



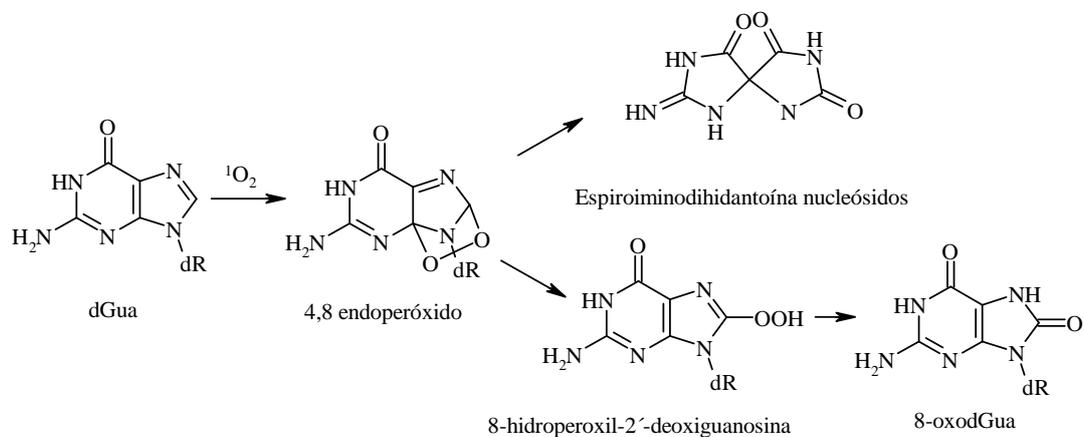
Esquema 2.9: Productos de degradación de 2'-desoxitimidina en ADN mediante mecanismo Tipo I.

2.7.3 Fotooxidaciones Tipo II

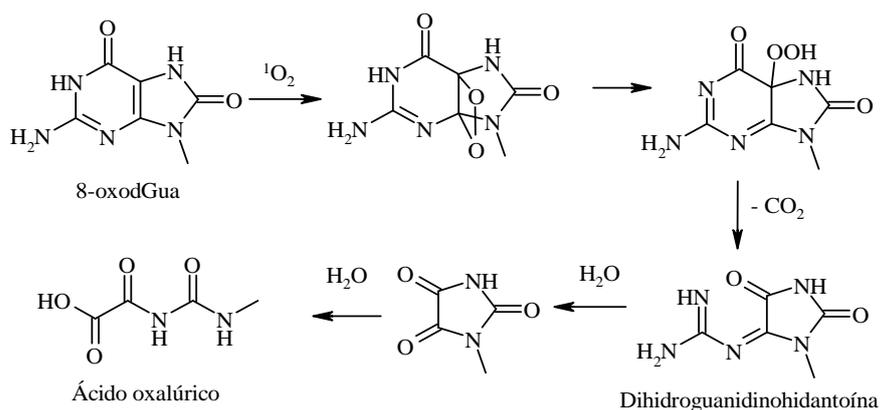
Como se explicó en la sección 1.4.2, en las reacciones de fotooxidación Tipo II participa el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). La guanina es el único componente del ADN que reacciona significativamente con $^1\text{O}_2$ (a pH neutro).³³ Se cree que la oxidación de guanina por $^1\text{O}_2$ involucra la formación de un endoperóxido inestable como resultado de una cicloadición [4+2] Diels Alder.³⁴ En un principio se consideró a los dos diastómeros (4R* y 4S*) de 4-hidroxi-8-oxo-4,8-dihidro 2'-desoxiguanosina (4-OH-8-oxo-dGua) como los productos estables de descomposición de los endoperóxidos.³⁵ Posteriormente, se demostró que esos diastómeros se reordenan para dar nucleósidos de espiroiminodihidantoína.³⁶ Sin embargo, esos productos no fueron detectados en la reacción del $^1\text{O}_2$ con el ADN doble cadena. En esta reacción se encontró 8-oxodGua como producto mayoritario. La formación de 8-oxodGua se debería a un reordenamiento del 4,8-endoperóxido en 8-hidroperoxil-2'-desoxiguanosina, seguido de una reducción (Esquema 2.10).

La 8-oxodGua tiene un potencial de oxidación menor que dGua (aproximadamente 0,5 eV menor)³⁷ y su constante de reacción con $^1\text{O}_2$, respecto a dGua, es dos órdenes de

magnitud mayor,³⁸ por lo tanto es un excelente sustrato tanto para reacciones de fotooxidación Tipo II (Esquema 2.11). Dos de ellos, la espiroiminohidantoina y la guanidinodihidantoina son altamente mutagénicos *in vivo*.³⁹



Esquema 2.10: Productos de degradación de 2'-deoxiguanosina mediante mecanismo Tipo II.



Esquema 2.11: Productos de degradación de 8-oxodGua mediante mecanismo Tipo II.

2.8 Algunas aplicaciones de las reacciones fotosensibilizadas en medicina.

Si bien, tal como se describió en las secciones precedentes, la fotosensibilización del ADN tiene consecuencias indeseables *in vivo*, puede usarse en aplicaciones positivas, tales como esterilización de productos sanguíneos para transfusión,⁴⁰ o también en lo que se conoce como terapia fotodinámica para el tratamiento de tumores cancerígenos.⁴¹

Las transfusiones sanguíneas están asociadas a riesgos de transmisión de infecciones virales, como HIV, virus de hepatitis A, B y C y herpes simple entre otros. La esterilización por calor de la sangre es muy efectiva y ha sido extensamente utilizada, pero provoca severos daños sobre los componentes celulares. Así, la foto-descontaminación de la sangre es una de las técnicas más prometedoras para destruir los virus. Se adiciona un

fotosensibilizador a una muestra de sangre y se ilumina con una fuente de luz apropiada. En estas técnicas se intenta usar fotosensibilizadores inocuos y eficientes que puedan ser usados en muy baja concentración. Si esto se consigue, el método resulta efectivo y económico ya que se evita la etapa de separación del sensibilizador luego de la irradiación. Por este método pueden esterilizarse sangre, plasma, concentrado de plaquetas y concentrados de células sanguíneas. Para algunos virus, como el parvovirus B19 y el virus de la hepatitis A, muy resistentes a la esterilización por calor o agentes químicos, se ha observado que la foto-esterilización es un método particularmente apropiado.

La terapia fotodinámica se utiliza para tratar patologías como infecciones virales o bacterianas, problemas de piel y, especialmente, para el tratamiento de distintos tipos de tumores localizados. El método se basa en lograr una alta concentración del sensibilizador sólo en la zona afectada, y someterla a luz UV o visible, preferentemente.

En el tratamiento de terapia fotodinámica, los procesos fotosensibilizados pueden servir para destruir directamente a la célula tumoral (ya sea por inducción de necrosis y/o apoptosis). Asimismo, estos procesos pueden causar la destrucción de la vasculatura tumoral, produciendo así una respuesta inflamatoria aguda que atrae a leucocitos tales como células dendríticas y neutrófilos (activación de los mecanismos propios del sistema inmune).

La mayor ventaja de este método es la posibilidad de irradiar un área muy bien definida, mediante láser o fibras ópticas, sin dañar el tejido circundante. Sin embargo, los fotosensibilizadores actualmente en uso, porfirinas y hematoporfirinas, tienen algunos efectos secundarios, siendo por ello necesario encontrar fotosensibilizadores más adecuados.

2.9 Referencias

- 1 M. Rovira, *El sol*, 1ra edición (Colección Ciencia Joven22), Buenos Aires, Eudeba (2007)
- 2 F. P. Gasparro, *Sunscreens: The Molecules and Their Photochemistry*, In *Sunscreen Photobiology*, New York: Springer-Verlag (1997)
- 3 H. Sigel, R. Griesser, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, 34, 875–900
- 4 B. Song, G. Oswald, M. Bastian, H. Rigel, B. Lippert, *Metal-Based Drugs*, **1996**, 3, 131–141
- 5 A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Principios de Bioquímica*, Segunda edición, Omega (1995)
- 6 J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, 171, 737–738
- 7 J.-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2001**, 63, 88–102
- 8 L. Daya-Grosjean, A. Sarasin, *Mutation Research*, **2005**, 571, 43–56
- 9 Y. Matsumura, H. N. Ananthaswamy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2004**, 195, 298–308
- 10 G. T. Wondrak, M. K. Jacobson, E. L. Jacobson, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2006**, 5, 215–237
- 11 T. P. Coohill, *Photochem Photobiol.*, **1987**, 46, 1043–1050
- 12 Y. Hiraku, K. Ito, K. Hirakawa, S. Kawanishi, *Photochem photobiol.*, **2007**, 83, 205–212

- 13 J. Cadet, C. Anselmino, T. Douki, L. Voituriez, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1992**, 15, 277–298
- 14 S. Kumar, N. D. Sharma, R. J. H. Davies, D. W. Phillipson, J. A. McCloskey, *Nucleic Acid Res.*, **1987**, 15, 1199–1216
- 15 T. M.G. Koning, R. J. H. Davies, R. Kaptein, *Nucleic Acid Res.*, **1990**, 18, 277–284
- 16 H. C. Wei, Q. Y. Cai, R. Rahn, X. S. Zhang, *Free Radic. Biol. Med.*, **1997**, 23, 148–154
- 17 A. Sancar, *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 2203–2237
- 18 T. Delatour, T. Douki, C. D’Ham, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1998**, 9, 105–116
- 19 E. L. Jacobson, M. K. Jacobson, G. T. Wondrak, *Photochem. Photobiol. Sci*, **2006**, 5, 215–237
- 20 S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, **2006**, 103, 37, 13765–13770
- 21 S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 617–618.
- 22 S. Steenken, *Chem. Rev.*, **1989**, 98, 503–520
- 23 B. Giese, *Acc. Chem. Res.*, **2000**, 33, 631–636
- 24 G.B. Schuster, *Acc. Chem. Res.*, **2000**, 33, 253–260
- 25 C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 14052–14055
- 26 L. P. Candeias, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc*, **1989**, 111, 1094–1099
- 27 J. Cadet, M. Berger, G. W. Buchko, P. C. Josh, S. Raoult, J. –L. Ravanat, *J. Am. Chem. Soc*, **1994**, 116, 7403–7404
- 28 V. Shafirovich, J. Cadet, D. Gasparutto, A. Dourandin, N. E. Geacintov, *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**, 14, 233–241
- 29 L. Changyuan, L. Weizhen, W. Wenfeng, H. Zhenhui, Y. Side, L. Nianyun, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2000**, 2, 329–334
- 30 J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J.-L. Ravanat, *Mutat. Res.*, **2003**, 531, 5–23
- 31 M. L. Wood, A. Esteve, M. L. Morningstar, G. M. Kuziemko, J. M. Essigmann, *Nucleic acids Res.*, **1992**, 20, 6023–6032
- 32 C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 10446–10447
- 33 J. Cadet, R. Téoule, *Photochem. Photobiol.*, **1978**, 28, 661–667
- 34 C. Sheu, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 10446–10447
- 35 J.–L. Ravanat, J. Cadet, *Chem. Res. Toxicol.*, **1995**, 8, 379–388
- 36 W. Luo, J. G. Muller, R. M. Rachin, C. J. Burrows, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 613–616
- 37 R. Bernstein, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 464–465
- 38 J. Cadet, M. Berger, G. W. Buchko, M.-F. Incardona, B. Morin, S. Raoul, J.–L. Ravanat, *DNA oxidation: Characterization of the damage and mechanistic aspects*, in R. Paoletti, (ed.): *Oxidative processes and antioxidants*, Raven Press, New York, (1994) 97–115
- 39 P. T. Henderson, J. C. Delaney, J. G. Muller, W. L. Neeley, S. R. Tannenbaum, C. J. Burrows, J. M. Essigmann, *Biochemistry*, **2003**, 42, 9257–9262
- 40 A. Minnock, D. I. Vernon, J. Schofield, J. Griffiths, H. J. Parish, S. B. Brown, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, **1996**, 32, 159–164
- 41 B. W. Henderson, T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.*, **1992**, 55, 145–157

Capítulo 3

Propiedades químicas y bioquímicas de Lumazinas

Las pteridinas son una familia de compuestos orgánicos heterocíclicos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Están presentes en prácticamente todos los seres vivos, pero, en general, en muy pequeñas cantidades. Estas moléculas desempeñan funciones muy diversas, participando en muchas reacciones bioquímicas de gran importancia. Los primeros trabajos científicos relacionados con las pteridinas, se llevaron a cabo a fines del siglo XIX (1889). En estos trabajos, se reflejan los primeros intentos por aislar algunos pigmentos de diferentes clases de mariposas.^{1,2,3} Años más tarde, se dilucidó la estructura molecular de estos pigmentos, proponiéndolos como derivados del heterociclo pirazina[2,3-d]pirimidina,^{4,5,6} al que finalmente se lo llamó pteridina (Figura 3.1).⁷

3.1 Estructura química y nomenclatura de las pteridinas

Las pteridinas tienen en común un doble anillo de diez átomos, cuatro de los cuales son átomos de nitrógeno; por lo cual pueden definirse como tetra-azo-naftalenos. En la Figura 3.1 puede observarse la estructura heterocíclica común a todas las pteridinas, y la numeración que reciben sus átomos. En particular, la molécula denominada, propiamente, pteridina es la forma aromática y sin sustituyentes del doble anillo (Figura 3.1). El anillo I corresponde a la estructura de la pirimidina, mientras que el anillo II a la de la pirazina.

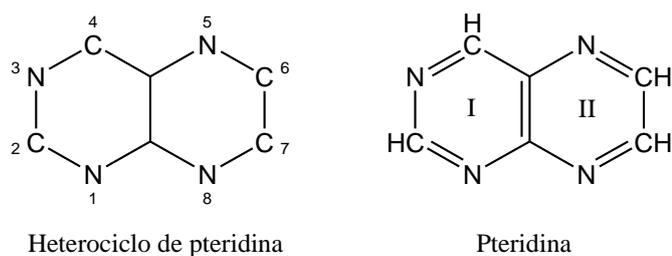


Figura 3.1: Estructura química común a todas las pteridinas. (I) Anillo pirimidínico y (II) anillo pirazínico.

Las pteridinas presentes en los seres vivos (“pteridinas naturales”) pueden considerarse derivadas de dos moléculas: 2-amino-4-pteridinona y 2,4-pteridindiona. De esta manera, las pteridinas que poseen un grupo amino en la posición 2 y un oxígeno en la 4 son denominadas genéricamente *pterinas* y a las pteridinas con un oxígeno en la posición 2 y otro en la posición 4 se las denomina genéricamente *lumazinas*. La estructura química

de estos compuestos se muestra en la Figura 3.2. También es habitual, encontrar derivados en los cuales el doble anillo se encuentra parcialmente hidrogenado. En particular, son muy comunes los 7,8-dihidro y 5,6,7,8-tetrahidro derivados de las pterinas y las lumazinas.

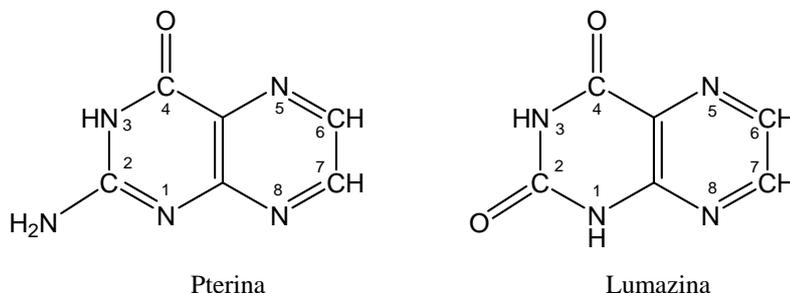
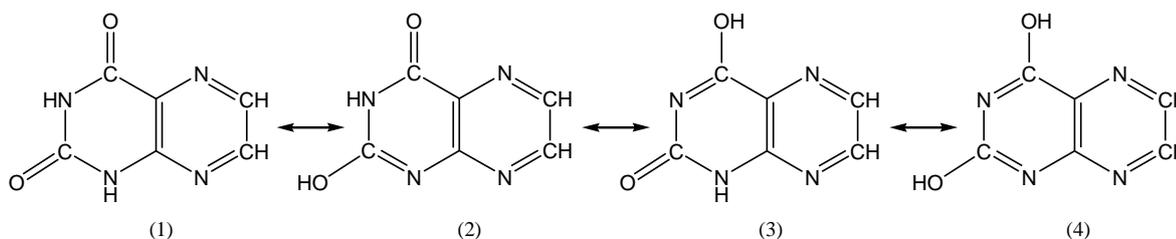


Figura 3.2: Estructura química de la pterina y la lumazina.

Como se dijo anteriormente, las lumazinas poseen dos átomos de oxígeno unidos a un anillo con dos átomos de nitrógeno. Como puede apreciarse en el Esquema 3.1, esta estructura le confiere la posibilidad de formar diferentes tautómeros. El tautómero 1 se denomina di-lactama mientras que el tautómero 4 se denomina di-lactima. Según los antecedentes que existen en la literatura, el tautómero 1 es el preponderante.^{8,9} Debido a esto, en todo el desarrollo de la tesis se representará a la lumazina y sus derivados mediante su tautómero más estable.



Esquema 3.1: Estructuras tautoméricas de la forma neutra de lumazina.

La mayor parte de las pteridinas presentes en la naturaleza poseen sustituyentes (-R) en el doble anillo. En la Tabla 3.1 se muestran las estructuras químicas correspondientes a dos de los derivados lumazínicos más estudiados y/o más relevantes desde el punto de vista biológico.

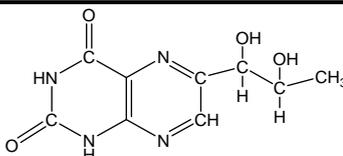
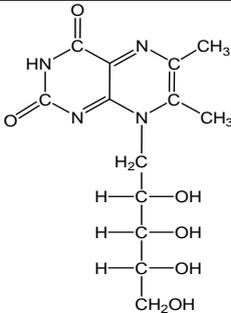
Estructura	Nombre
	Biolumazina (Blum)
	6,7-dimetil-8-ribitillumazina

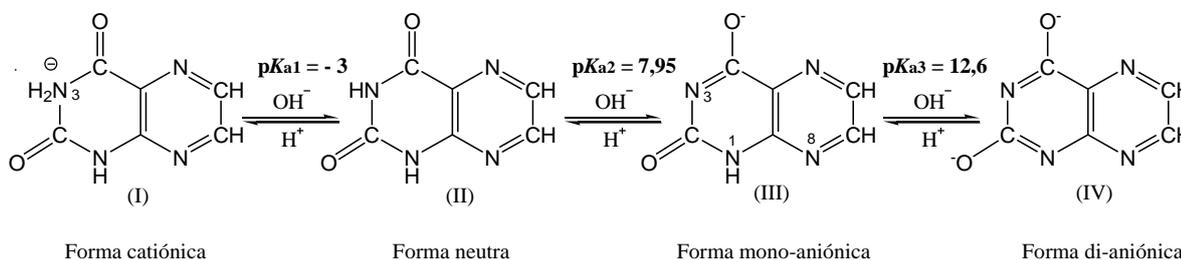
Tabla 3.1: Estructura química de algunos derivados lumazínicos

3.2 Propiedades ácido-base de las pteridinas

En los compuestos heterocíclicos deficientes en electrones π (como es el caso de las pteridinas) los átomos de nitrógeno le confieren un carácter básico mucho más débil que el de las aminas alifáticas, tanto cíclicas como acíclicas. Esta diferencia se debe a la participación de dos electrones del átomo de nitrógeno en el sistema de orbitales π . Por consiguiente, el par de electrones libres ocupa un orbital híbrido sp^2 . El mayor carácter s de este orbital conduce a una menor fuerza básica comparada con la de átomos en los cuales el par de electrones libres ocupa un orbital sp^3 . Los compuestos con dos átomos de nitrógeno en un mismo anillo son bases aún más débiles. Informes de la basicidad de derivados pteridínicos muestran que, como es de esperar teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, estos compuestos son también bases extremadamente débiles.¹⁰

En el Esquema 3.2 se muestra el equilibrio ácido-base más importante de lumazina en solución acuosa, teniendo en cuenta los valores de pH presentes en los sistemas biológicos. La forma ácida de este equilibrio corresponde a la forma neutra mostrada anteriormente (Figura 3.2 y Esquema 3.1), cuyos equilibrios tautoméricos fueron descritos. El H se encuentra formando parte de una función amida o, más correctamente teniendo en cuenta que se trata de un heterociclo, una lactama. La forma alcalina es un anión en el cual la carga negativa está localizada en el oxígeno dando lugar a una función lactima. En la literatura, existen numerosas publicaciones donde se presentan valores de las constantes de disociación de este equilibrio ácido-base, para distintos derivados

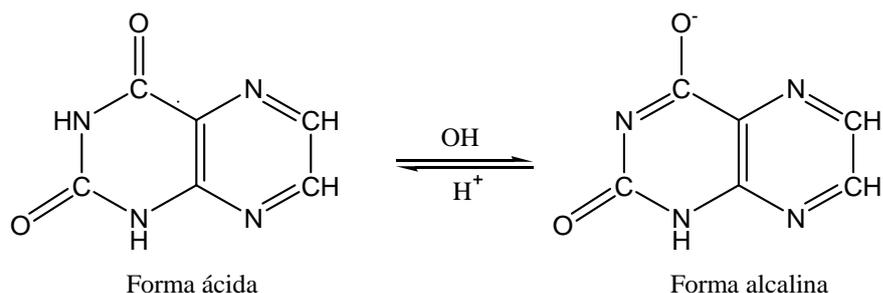
pteridínicos.^{10,11,12,13} En todos los casos estudiados, el valor de pK_a del equilibrio amida-fenolato es ~ 8 .^{10,13,14,15,16,17}



Esquema 3.2: Equilibrios ácido-base de Lumazina y sus tautómeros más relevantes presentes en solución acuosa, en todo el intervalo de pH.

Típicamente en el intervalo de pH comprendido entre 2 y 6 prevalece la forma neutra de la molécula. Por debajo de estos valores el nitrógeno anular más básico comienza a ionizarse apareciendo la primer forma catiónica. Todos estos equilibrios presentan valores de pK_a extremadamente bajos (inferiores a -3).¹⁰ En el intervalo de pH comprendido entre 7 y 9, el grupo amida se encuentra en equilibrio con su forma aniónica (lactima) y el doble anillo adquiere carga negativa, por la formación de la especie monoaniónica. En medio alcalino, pH comprendidos entre 9 y 11, está presente casi exclusivamente esta última forma (denominada “*forma alcalina*”). En condiciones de pH extremadamente alcalino ($pH > 13$) el equilibrio ácido-base que involucra una deprotonación del grupo oxo adicional se pone de manifiesto, dando lugar así a la formación de la especie dianiónica de lumazina.¹⁰

En este trabajo de tesis se investigaron propiedades fotoquímicas, fotofísicas y fotosensibilizadoras de un derivado pteridínico en particular, la lumazina propiamente dicha. Todos los experimentos presentados, se llevaron a cabo en condiciones de pH comprendido entre 4 y 11. En estas condiciones, el único equilibrio ácido-base importante, es aquél que involucra al grupo amida y al enólico (Esquema 3.3). Por lo tanto, en adelante se hará referencia a cada forma ácido-base de lumazina denominándolas “forma ácida” y “forma alcalina”, respectivamente.



Esquema 3.3: Equilibrio ácido-base de lumazina en solución acuosa, en el intervalo de pH comprendido entre 2 y 11.

3.3 Espectros de absorción

Los espectros de absorción de lumazina (Lum) en solución acuosa dependen de varios factores: si están o no parcialmente reducidas, de la naturaleza química del o los sustituyentes y de las condiciones de pH del medio. En esta sección, solo se hará una breve descripción de las principales características de los espectros de absorción de lumazina en solución acuosa; las cuales serán ampliadas en el Capítulo 9.

Dependiendo del pH de la solución, Lum presenta espectros con dos bandas (forma ácida) o tres bandas (forma alcalina). Estos espectros indican la presencia de, al menos, dos estados electrónicos singletes excitados. Las tres bandas de absorción de la forma alcalina presentan un corrimiento hacia el visible (a mayores longitudes de onda) respecto de las bandas correspondientes a la forma ácida (Figura 3.3).

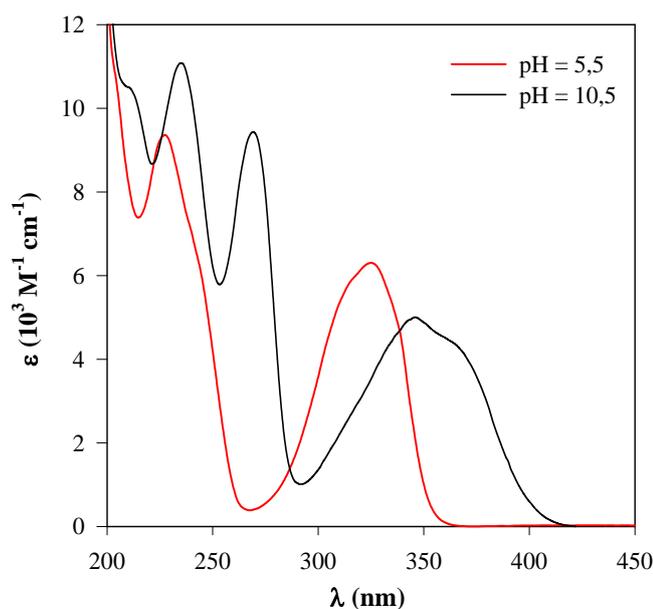


Figura 3.3: Espectros de absorción de Lumazina en solución acuosa.

3.4 Lumazinas en la naturaleza

Las lumazinas constituyen una importante familia de moléculas dado que, en primer lugar, la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina es el precursor natural de la síntesis de coenzimas oxidativas importantes, las flavinas.¹⁸ En segundo lugar, las lumazinas comparten características estructurales con el sistema de anillos isoaloxazina de las flavinas, y puede servir de modelo para estos compuestos (Figura 3.4). Además, poseen una serie de grupos funcionales cuya interacción es de interés químico en general.¹⁹ Asimismo, ciertos derivados de lumazina se han encontrado como pigmentos en animales inferiores tales como en la langosta migratoria²⁰ y en la sanguijuela de agua dulce *Limnatis nilotica*.²¹ Como ya se ha demostrado extensamente, las pteridinas tienen un rol fundamental en la pigmentación de los insectos, pero muchas veces su cantidad excede la necesaria para producir color.²² En algunos casos, se ha postulado que las pteridinas en las alas de mariposas de la familia Pieridae no es simplemente un pigmento, sino un producto final del metabolismo del nitrógeno, sin embargo aún no hay una explicación al respecto.

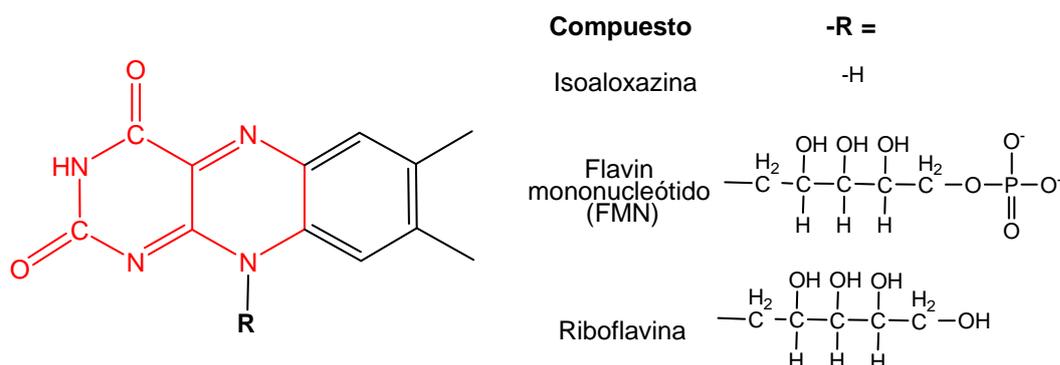
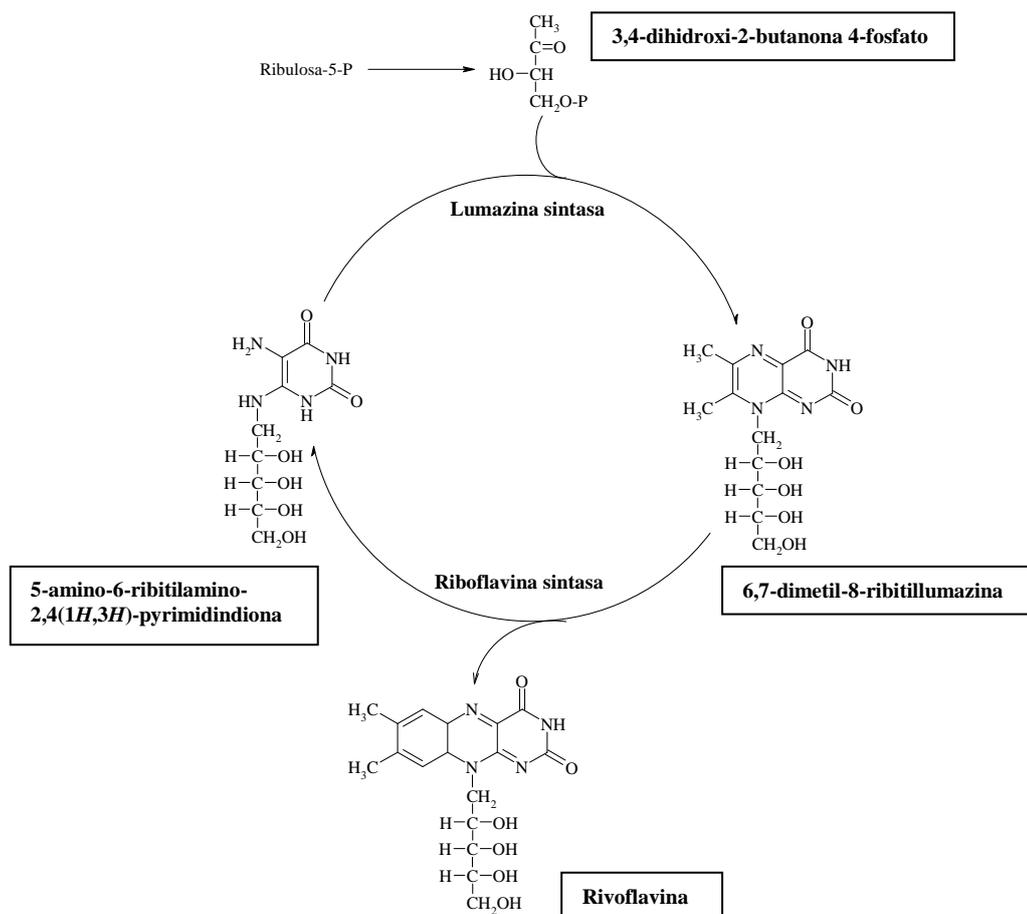


Figura 3.4 Estructura química de isoaloxazina y sus derivados biológicos más importantes. En rojo se resalta la estructura equivalente a lumazina.

También se ha determinado que la fluorescencia azul de bacterias marinas del género *Photobacterium*, se debe a una molécula de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina que es el grupo prostético de una proteína de función aún no dilucidada.²³ Las lumazinas son también productos de degradación de las pterinas no conjugadas, siendo lumazina y 7-hidroxiolumazina los principales metabolitos de la degradación de 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina y de 5,6,7,8-tetrahidroneopterina en ratas y ratones.²⁴ Finalmente, la presencia de lumazinas en los seres vivos con función aún desconocida, hace que el estudio de las propiedades de esta molécula sea de interés.

3.4.1 Síntesis de riboflavina

El complejo vitamínico B es un grupo de vitaminas hidrosolubles imprescindibles para el correcto funcionamiento del cerebro y el metabolismo corporal. Dentro de este grupo se encuentra la riboflavina, una molécula que es sintetizada a partir de una molécula de lumazina. La riboflavina tiene un rol clave en el mantenimiento de la salud en animales, siendo el componente esencial de los cofactores flavín adenín dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN). Los animales carecen del sistema enzimático de síntesis de riboflavina y dependen de la vitamina presente en los alimentos que ingieren diariamente. Bacterias y plantas sí sintetizan riboflavina siendo el precursor un derivado de lumazina, específicamente 6,7-dimetil-8-ribitillumazina. Este derivado es sintetizado en una reacción catalizada por la lumazina sintasa (Esquema 3.4), una enzima extensamente estudiada dada la importancia de esta reacción en la síntesis de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina. Una vez sintetizada se condensa a una piridina, 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinediona, para formar la riboflavina. Esta última reacción es catalizada por la riboflavina sintasa (Esquema 3.4).



Esquema 3.4 Biosíntesis de riboflavina.

La riboflavina tiene estructura heterocíclica de isoaloxazina con una cadena de ribitol. Esta vitamina es sensible a la luz solar y a ciertos tratamientos, como la pasteurización, proceso que hace perder el 20% de su contenido. Por ejemplo, la exposición a la luz solar de un vaso de leche durante dos horas hace perder el 50% del contenido de esta vitamina. Algunas fuentes de riboflavina son: leche, queso, vegetales de hoja verde, hígado, legumbres así como productos derivados de la soja, levadura y almendras.

3.4.2 Pterina-deaminasa

Se conoce desde hace muchos años que las lumazinas son productos del catabolismo enzimático de las pterinas.²⁵ Se observó que en extractos celulares de bacterias, diversas pterinas son convertidas en su correspondiente lumazina. La enzima pterina-deaminasa cataliza la reacción química que convierte pterina en lumazina.

Esta enzima es específica para pterinas y el sustituyente de la posición 6 no afecta considerablemente la especificidad de la misma, exceptuando los grupos hidroxilos, dado que se ha observado que la xantopterina no es sustrato para la enzima. Tampoco son sustratos pterinas con sustituyentes en la posición 7 o dihidropterinas.

Aunque el papel de esta enzima no ha sido aún bien dilucidado, se cree que su presencia regula la cantidad de cofactores pterínicos en la célula.

La lumazina se encuentra en el medio extracelular, al igual que la enzima pterin-deaminasa, de *Dictyostelium discoideum*, una ameba que se encuentra habitualmente en el lodo. Esta ameba tiene un ciclo celular con diferentes etapas, y se presume que la lumazina es una señal fisiológica durante su desarrollo.^{26,27,28} La lumazina encontrada en el medio es la responsable de una intensa emisión fluorescente, sensible al pH.^{13,29}

3.4.3 Antenas

Como ya se mencionó anteriormente, 6,7-dimetil-8-ribitillumazina es el precursor biosintético de la riboflavina. Sin embargo, este derivado tiene también una función muy diferente: es el responsable de la emisión bioluminiscente en bacterias marinas del género *Photobacterium*.³⁰ En estas bacterias la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina se encuentra unida a una proteína llamada proteína lumazina.

El origen de la bioluminiscencia es la oxidación de luciferina (sustratos diversos de bajo peso molecular) en presencia de una enzima, la luciferasa. En dicha oxidación se produce emisión de luz, con un máximo entre 485 y 495 nm. Sin embargo en presencia de proteína lumazina la emisión está corrida y el máximo se encuentra a 475 nm.

Este fenómeno observado, se debe a la asociación de dos proteínas: la enzima *Photobacterium luciferasa* y la proteína lumazina. La energía de dicha reacción se transfiere no radiativamente a la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina de la proteína lumazina, generando estados excitados que emiten fluorescencia. El espectro de emisión coincide con el espectro de fluorescencia de la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina siendo, entonces, dicha lumazina la molécula emisora.

La proteína lumazina no tiene actividad catalítica alguna y se cree que actúa como transductor óptico (sistema de comunicación y control que responde automáticamente cuando recibe un mensaje o señal). Sin embargo, su función real o específica es aún desconocida. Dadas las similitudes de esta proteína, puede inferirse que tiene el mismo origen evolutivo que la enzima riboflavina sintasa.³¹

3.5 Referencias

- 1 F. G. Hopkins, *Proc. Chem. Soc.*, **1889**, 5, 117
- 2 F. G. Hopkins, *Nature (London)*, **1889**, 40, 335,
- 3 F. G. Hopkins, *Philos. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B*, **1895**, 186, 661
- 4 R. Purrmann, *Liebigs Ann. Chem.*, **1940**, 544, 182
- 5 R. Purrmann, *Liebigs Ann. Chem.*, **1940**, 546, 98
- 6 R. Purrmann, *Liebigs Ann. Chem.*, **1941**, 548, 284
- 7 C. Schöpf, R. Reichert, K. Riefstahl, *Liebigs Ann. Chem.*, **1941**, 548, 82
- 8 D. J. Brown, E. Hoerger, S. F. Mason, *J. Chem. Soc.*, **1955**, 211
- 9 A. Albert, G. B. Barlin, *J. Chem. Soc.*, **1962**, 3129
- 10 A. Albert, *Biochem. J.*, **1953**, 54, 646-654
- 11 A. Albert, D. J. Brown, G. Cheeseman, *J. Chem. Soc.*, **1951**, 474
- 12 A. Albert, H. C. S. Wood, *J. appl. Chem.*, **1952**, 2, 591
- 13 R. Klein, I. Tatischeff, *Photochem Photobiol.*, **1987**, 45, 55-65
- 14 V. D. Monópoli, A. H. Thomas, A. L. Capparelli, *Int. J. Chem. Kinet.*, **2000**, 32, 231-237
- 15 A. H. Thomas, G. Suárez, F. M. Cabrerizo, R. Martino, A. L. Capparelli, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2000**, 135, 147-154
- 16 A. H. Thomas, M. R. Feliz, A. L. Capparelli, *Transition Metal Chemistry*, **1996**, 21, 317-321
- 17 C. Lorente, A. L. Capparelli, A. H. Thomas, A. M. Braun, E. Oliveros, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, 3, 167
- 18 K. Kis, K. Kugelbrey, A. Bacher, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 2555-2559
- 19 R. Stewart, R. Srinivasanan, S. J. Gumbley, *Can. J. Chem.*, **1981**, 59, 2755-2765
- 20 V. Němec, A. de Loof, *Eur. J. Entomol.*, **2003**, 100, 19-23
- 21 G. Voerman, S. Cavalli, G. A. van der Marel, W. Pfeleiderer, J. H. van Boom, D. V. Filippov, *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68 (6), 938-41
- 22 R. Harmsen, *J. Exp. Biol.*, **1966**, 45, 1-13
- 23 P. Koka, J. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, 76(7), 3068-72

- 24 H. Rembold, V. Chandrashekar, P. Sudershan, *Biochim. Biophys. Acta*, **1971**, 237, 365–368
- 25 B. Levenberg, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.*, **1959**, 234, 955-961
- 26 P. Pan, E. M. Hall, J. T. Bonner, *J. Bacteriol.*, **1975**, 122(1), 185-191
- 27 Gerisch et al. **1982**
- 28 I. Tatischeff, R. Klein, G. Tham, *Lumazine formation in the extracellular medium of aggregating Dictyostelium discoideum AX-2 cells*. In W. Pfeleiderer, H. Wachter and H.C. Curtius, eds., *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*, vol. 3, Walter de Gruyter and Co, **1984**, 171-182
- 29 I. Tatischeff, R. Klein, G. Tham, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1984**, 365, 1255-1262
- 30 J. Lee, B. G. Gibson, D. J. O'kane, A. Kohnle, A. Bacher, *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 210,711 -719
- 31 L. Chatwell, V. Illarionova, B. Illarionov, W. Eisenreich, R. Huber, A. Skerra, A. Bacher, M. Fischer, *J. Mol. Biol.*, **2008**, 382, 44–55

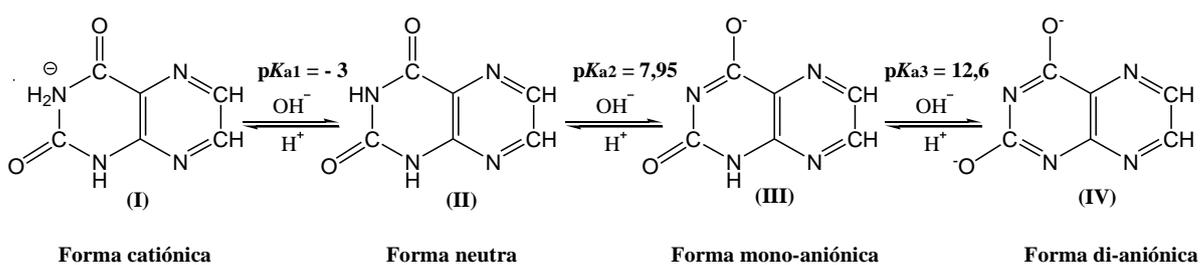
Capítulo 4

Fotofísica, fotoquímica y propiedades fotosensibilizadoras de pteridinas

De acuerdo a lo expuesto por Klein *et. al.*¹⁰, Lumazina (Lum) es una molécula con características anfotéricas y cada una de sus formas ácido-base puede estar presente en diferentes formas tautoméricas. El presente capítulo tiene por objeto condensar la información acerca de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de Lum descritas en la literatura, como así también, los antecedentes en fotosensibilización existentes para esta familia de compuestos.

4.1 Fluorescencia de lumazina: espectros de emisión y excitación

Tal como se describió en el capítulo anterior, en solución acuosa, Lum presenta diferentes equilibrios ácido-base, según cuál sea el pH del medio en el que se encuentra disuelta.^{1,2,3} En el Esquema 4.1 se representan los equilibrios ácido-base presentes en todo el intervalo de pH. Brevemente, Lum puede presentar tres equilibrios ácido-base típicos ($pK_{a1} = -3$, $pK_{a2} = 7,95$ y $pK_{a3} = 12,6$). En soluciones extremadamente ácidas se pueden protonar los átomos de nitrógeno de la molécula, dando lugar a la formación de especies protonadas o catiónicas. A medida que se incrementa el pH, entre 1 y 6,5, se da lugar a la formación de la forma neutra de Lum (II). A valores de pH comprendidos entre 9 y 11 la especie III es la especie predominante. Finalmente, a valores de pH > 13.5 la especie predominante es la especie di-aniónica (IV).



Esquema 4.1: Equilibrios ácido-base de Lumazina presentes en solución acuosa, en todo el intervalo de pH.

Como es de esperar, dado que cada forma ácido-base presenta una configuración y/o distribución electrónica particular, sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas serán fuertemente dependientes del pH, tal como se ha observado para otros compuestos pertenecientes a la familia de las pteridinas.^{4,5,6,7,8,9} En 1987, Klein *et. al.*¹⁰ llevaron

adelante un estudio detallado acerca de las características espectroscópicas y, en particular, de la fluorescencia de Lum bajo diferentes condiciones de pH. A continuación se detallan sus principales resultados y conclusiones.

4.1.1 Análisis de soluciones extremadamente alcalinas (pH = 14)

En estas condiciones de pH la forma IV (di-aniónica) representa más del 96% de la especie en estado fundamental predominante en solución acuosa. Los espectros de absorción y excitación se superponen perfectamente, mostrando dos bandas de absorción con máximos alrededor de 252 y 368 nm. Asimismo, se determinó el valor del rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) para cada longitud de onda de excitación. El valor de Φ_F obtenido en esta condición de pH fue de $0,030 \pm 0,003$. Por otra parte, el espectro de emisión presenta una única banda de emisión ($\lambda_{em} \sim 490$ nm), y la misma representa la imagen especular de la banda de absorción. Estos resultados sugieren la presencia de una única especie emisora (la forma IV en su estado excitado).

4.1.2 Análisis de soluciones alcalinas (pH = 10)

En estas condiciones de pH la especie química predominante es la forma mono-aniónica de Lum (III). El comportamiento fotofísico de III es un poco más complejo en relación a lo observado para IV. Esta forma ácido-base de Lum presenta, en el estado fundamental, dos especies tautoméricas. Esta condición se ve reflejada en el comportamiento fotofísico particular observado a pH 10. El espectro de excitación de III, tal como se verá en el Capítulo 9, presenta algunas diferencias respecto de su correspondiente espectro de absorción. Por su parte, la forma del espectro de emisión es independiente de la longitud de onda de excitación, mostrando un máximo de emisión alrededor de 467 nm.

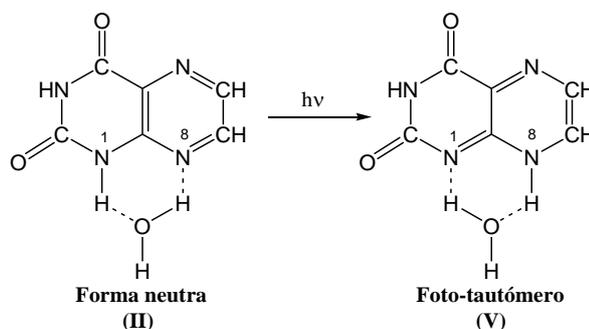
4.1.3 Análisis de soluciones moderadamente ácidas (pH = 6,8 y 5)

En solución acuosa en esta condición de pH, relativamente cercano al valor de pK_{a2} , coexiste la especie neutra de Lum (II) conjuntamente con la especie mono-aniónica. A pH 6,8 el 9% de Lum se encuentra en su forma mono-aniónica, mientras que a pH 5 solo el 0,16%. Este fenómeno se puede apreciar en los espectros de absorción y excitación (a pH

6,8), en donde aparecen bandas de absorción centradas en 225 y 330 nm que corresponden a la especie II, y bandas alrededor de 270 y 350 nm que corresponden a la especie III.

En concordancia con estos resultados, los espectros de emisión (pH 6,8) muestran la presencia de dos estados excitados emisores: (i) uno cuya banda de emisión está centrada en 467 nm, que se obtiene al excitar a 370 nm. El mismo corresponde a la especie III ($\Phi_F = 0,24$); y (ii) otro, que se obtiene al excitar la muestra con radiación de longitud de onda ~ 330 nm, que presenta una emisión centrada en 481 nm ($\Phi_F = 0,06$).

En este punto es interesante remarcar que esta última emisión presenta un corrimiento Stokes extremadamente largo respecto de su correspondiente espectro de absorción. Este resultado indica que el estado singlete excitado de II no sería la especie emisora propiamente dicha, sino el foto-tautómero (V) proveniente del reordenamiento representado en el Esquema 4.2.



Esquema 4.2: Foto-tautomerización de la forma neutra de Lumazina observada en condiciones de pH inferiores a 7.

Al contrario de lo observado y descrito en el párrafo anterior, en condiciones de pH igual a 5, el espectro de excitación ajusta o coincide perfectamente bien con su correspondiente espectro de absorción. Por su parte, el espectro de emisión sólo mostró una banda centrada en 481 nm. Estos resultados indican que a pH inferiores y lo suficientemente alejados del valor de pK_{a2} , II es la especie predominante no solo en el estado fundamental, sino también en el estado excitado.

4.1.4 Análisis de soluciones extremadamente ácidas (pH = 1,5)

Por último, los autores analizaron la naturaleza de las especies emisoras en condiciones de pH fuertemente ácidas (pH 1,5). En estas condiciones, en el estado fundamental, y tal como se muestra en el Esquema 4.1, la especie II es la forma ácido-base predominante. A pH 1,5, se puede ver la presencia de dos bandas de emisión: una de mayor

intensidad centrada en 505 nm y la otra, de menor intensidad, centrada en 380 nm. En todos los casos, los espectros de excitación (tanto aquellos registrados monitoreando la emisión a 480 nm como los registrados a 380 nm) son coincidentes con el espectro de absorción de Lum a pH 1,5. De lo que se deduce que se generan dos especies emisoras a partir del mismo estado fundamental (la forma neutra de Lum). Estas especies emisoras fueron asignadas a la forma I (emisión a 505 nm) y II (emisión a 380 nm), respectivamente.

4.2 Fosforescencia de Lumazina a temperatura ambiente y a 77 K

Asimismo, también se ha caracterizado la fosforescencia de un gran número de derivados pteridínicos, entre los que se incluye Lum. Parker R. T., *et. al.*¹¹ estudiaron la emisión fosforescente, a temperatura ambiente, de soluciones alcalinas de Lum. Para lograr detectar la fosforescencia de Lum en estas condiciones de temperatura, los autores recurrieron al método de detección en fase sólida. En particular, se usó papel de filtro de tipo *Whatman 1*, en donde se impregnó una cantidad estandarizada de solución alcalina de Lum y luego se eliminó todo resto de agua colocando el papel impregnado en un desecador durante 24 hs. En ciertos casos, para incrementar aún más la señal fosforescente, el papel *Whatman* fue previamente impregnado con acetato de sodio. Los resultados obtenidos se listan en la Tabla 4.1 extraída directamente de la publicación. Si bien, por este método no se obtienen resultados cuantitativos, claramente se puede apreciar que, bajo excitación a 370 nm, Lum impregnada en fase sólida presenta una emisión fosforescente muy débil, que puede ser ligeramente incrementada cuando la fase sólida es tratada con acetato de sodio. Esta emisión ocurre alrededor de los 510 nm, tal como se muestra en la Tabla 4.1.

compound	excitation maxima, nm ^a	emission maxima, nm ^a	relative phosphorescence intensity		intensity ratio DF/P ^d
			NaOAc/paper ^{b,c}	paper ^{b,c}	
pterin-6-carboxylic acid	375	505	strong (100)	very weak (1.4)	0.25
6-hydroxymethylpterin	375	515	moderate (15)	not measured	0.11
pterin	370	505	strong (57)	very weak (0.8)	0.13
pterin-6-aldehyde	375	515	weak (8.1)	very weak	0.20
lumazine (2,4-Dihydroxypteridine)	370	510	moderate (28)	very weak (1.2)	0.12
4-hydroxypteridine	350	490	weak (6.6)	0	0
folic acid	380	520	weak (7.4)	0	0.12
isoxanthopterin (7-Hydroxypterin)	345	495	very weak (3)	0	0
xanthopterin (6-Hydroxypterin)	-	-	0	0	-

^a Peak maxima are reported for the compounds adsorbed on sodium acetate treated paper. ^b Whatman #1 filter paper was employed. ^c Wavelengths are rounded off to the nearest 5 nm. Relative intensities are given in parentheses for 5 nmol of adsorbed compound. The emission intensity of pterin-6-carboxylic acid has been arbitrarily set at 100. ^d DF/P = emission intensity of the delayed fluorescence divided by the emission intensity of the phosphorescence.

Tabla 4.1: Características de la fosforescencia a temperatura ambiente de un grupo de pteridinas impregnadas sobre papel de filtro *Whatman 1*, con y sin tratamiento previo de acetato de sodio.¹¹

Por otra parte, se hicieron estudios en condiciones de baja temperatura (77 K).¹¹ Los mismos se llevaron a cabo sobre matriz sólida de metanol alcalino, para prevenir la ruptura de los tubos de cuarzo en el momento de la congelación. A pesar de no presentar ningún resultado al respecto, los autores indican que el comportamiento observado a bajas temperaturas (77 K) fue similar al observado a temperatura ambiente en términos del tipo y características de las bandas de emisión observadas. En estas condiciones, también pudo apreciarse una segunda banda de mayor energía (alrededor de 460 nm) correspondiente a la fluorescencia que también pudo detectarse.

4.3 Propiedades fotosensibilizadoras de pteridinas

Si bien para Lum no hay estudios sistemáticos de fotosensibilización de biomoléculas, existen en literatura diversos trabajos sobre las propiedades fotosensibilizadoras de las pterinas. A fines de los 90' apareció el primer trabajo que confirmó que estos compuestos son capaces de fotoinducir modificaciones químicas en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Sin embargo, muy recientemente se iniciaron investigaciones sistemáticas tendientes a evaluar la capacidad fotosensibilizadora de las pteridinas sobre diferentes biomoléculas, como así también a dilucidar los mecanismos de reacción involucrados. A continuación se hará una breve descripción de los principales resultados hallados en este sentido.

4.3.1 Fotosensibilización de bases púricas y desoxirribonucleótidos por pterinas

Existen antecedentes en la literatura sobre estudios de fotosensibilización de monómeros del ADN por pterinas. El más antiguo es de Santus y Momzikoff.¹² En ese estudio se cuantificó el porcentaje de degradación de las bases púricas (adenina, guanina, xantina e hipoxantina) irradiadas en presencia de 2-amino-4-pteridinona o pterina (Ptr), xantopterinina o isoxantopterinina en una solución buffer de fosfato de pH = 8,4. La fotodegradación se cuantificó mediante una reacción colorimétrica. Los autores concluyeron, en primer lugar, que los sustratos que más se degradan son guanina y xantina y en segundo lugar que la pterina no sustituida tiene un efecto sensibilizador superior que aquellas con sustituyentes hidroxilos (xantopterinina e isoxantopterinina). Respecto al mecanismo de fotosensibilización, postulan que las pterinas son capaces de actuar mediante ambos mecanismos (Tipo I y Tipo II).

Recientemente, a partir del año 2003 en adelante,^{13,14,15,16} se realizaron estudios sistemáticos usando Ptr como sensibilizador y principalmente dos nucleótidos (2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP) y 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP) como sustratos. Se realizaron experimentos en los cuales soluciones acuosas con Ptr y un nucleótido, se irradiaron en condiciones en las cuales la radiación sólo es absorbida por Ptr. Dichos experimentos arrojaron varios resultados relevantes, los cuales se detallan a continuación:

✓ El nucleótido dAMP es fotosensibilizado por Ptr en medio ácido mediante un mecanismo Tipo I. Durante la reacción sólo se consume el nucleótido. La presencia de O₂ es indispensable para que la reacción ocurra y el ¹O₂, a pesar de ser generado por el sensibilizador, no participa como intermediario. El proceso genera H₂O₂ y se acelera en presencia de superóxido dismutasa (SOD), enzima que cataliza la descomposición del anión superóxido (O₂^{•-}). El nucleótido dAMP no es fotosensibilizado por Ptr en medio alcalino (pH = 10,5).

✓ Se identificaron dos productos de oxidación de dAMP: uno de ellos, 8-oxo-7,8-dihidro 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (8-oxo-dAMP) (Figura 4.1), el cual ya había sido identificado como producto de oxidación fotoinducida por otros sensibilizadores que actúan a través de mecanismos Tipo I. Al segundo, debido a la inexistencia de su estructura en literatura, y en base a los espectros de masa obtenidos se le propuso una estructura cíclica (Figura 4.1).

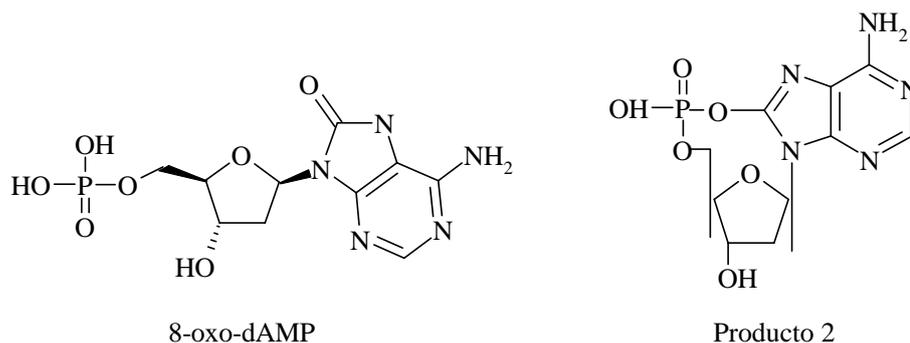


Figura 4.1: Estructuras químicas de los productos de oxidación de dAMP.

✓ El nucleótido dGMP es fotosensibilizado por Ptr en medio ácido en un proceso en el que el sensibilizador no se consume y que sólo ocurre en condiciones aeróbicas. Durante la reacción se consume O₂, se produce H₂O₂ y varios productos altamente polares. Adicionalmente se encontró que el O₂^{•-} actúa como inhibidor de la reacción y que la

fotooxidación en medio ácido no ocurre principalmente vía $^1\text{O}_2$. El proceso de transferencia de electrones como etapa inicial del proceso fotosensibilizado fue confirmado mediante la detección del radical guanina en su forma neutra (dGMP(-H) \cdot) en experimentos de fotólisis de destello láser. El nucleótido dGMP, a diferencia de dAMP, es fotosensibilizado por Ptr en medio alcalino. Se encontró que durante la reacción dGMP y O_2 se consumen, la concentración de Ptr permanece constante y se producen H_2O_2 y varios productos polares provenientes de la oxidación del nucleótido. En esta condición de pH, la fotooxidación ocurre principalmente vía $^1\text{O}_2$.

4.3.2 Fotosensibilización de ADN eucariota por pterinas

4.3.2.1 Hidroxilación de desoxiguanosina en ADN fotoinducida por derivados pterínicos

Kawanishi *et al.*^{17,18} demostraron que al exponer ADN eucariota de doble hebra, a radiación de 365 nm, en presencia de Ptr, carboxipterina (Cap), biopterina (Bip), neopterina (Nep) y ácido fólico (Pteglu) se producen lesiones en secuencias específicas del mismo. La eficiencia del daño al ADN inducida por luz UV-A decrece en el sentido $\text{Ptr} \approx \text{Cap} > \text{Bip} \approx \text{Nep} \gg \text{Pteglu}$. Al utilizar xantopterina o isoxantopterina como sensibilizadores, no observaron daño.

En estos estudios, demostraron que las oxidaciones y rupturas se encontraban en secuencias con varias guaninas consecutivas (secuencias poli-G: 5'-GG-3', 5'-GGG-3' y 5'-GGGG-3'). Basándose en los productos de reacción detectados en experimentos de EPR y en experiencias realizadas en D_2O postularon que el daño fotoinducido al ADN consiste en una oxidación fotosensibilizada Tipo I. El mecanismo de fotosensibilización propuesto puede resumirse de la siguiente manera: El sensibilizador (Ptr, Cap, Bip o Nep) excitado oxida al nucleótido por medio de un proceso de transferencia de electrones. La oxidación de guanina ocurre principalmente en secuencias con varias G consecutivas. Esto se debe a que el apilamiento de dos bases guanina en un fragmento de ADN doble cadena produce una disminución en el potencial de ionización. La descomposición del radical $\text{G}^{\bullet+}$ posteriormente sigue alguna de las vías conocidas de reacción, que fueron explicadas en el Capítulo 2. En particular, en estos estudios se detectó 8-oxo-guanosina probando la existencia de la vía de hidratación del radical. Por otra parte, el anión radical del

sensibilizador formado, puede oxidarse y regenerar el sensibilizador, por medio de una transferencia de electrones al O_2 produciendo anión superóxido y/o puede degradarse.

4.3.3 Fotosensibilización de ADN plasmídico por pterinas

4.3.3.1 Fotosensibilización del plásmido pUC18 por pterina

Por otra parte, también hay antecedentes en literatura acerca de la capacidad fotosensibilizadora de Ptr sobre otros tipos de ADN. En particular, se han descrito estudios de fotosensibilización bajo irradiación con luz UV-A del plásmido pUC18, usando Ptr como fotosensibilizador.^{13,19} El plásmido pUC18 es una molécula de ADN circular de doble hebra y bajo peso molecular.

En este trabajo, los autores demuestran que, cuando se irradia con luz UV-A (350 nm) soluciones de plásmido pUC18 en presencia de Ptr, las moléculas de ADN sufren cortes al azar en sus hebras. Estos cortes conducen a la transformación del topoisómero superenrollado al topoisómero relajado. La acumulación de estos cortes genera, en una segunda etapa, un corte en la doble hebra con la consiguiente transformación del plásmido circular en una molécula lineal (Figura 4.2).

Los autores encontraron que la reacción de fotosensibilización ocurre tanto en presencia como en ausencia de O_2 . Aún más, no observaron diferencias en la cantidad de plásmido relajado, producida por irradiación del mismo en presencia de Ptr, al variar la concentración de O_2 disuelta en la solución. Por lo tanto, descartan la participación de especies reactivas de oxígeno en el mecanismo de clivaje del plásmido (entre ellas, al 1O_2).

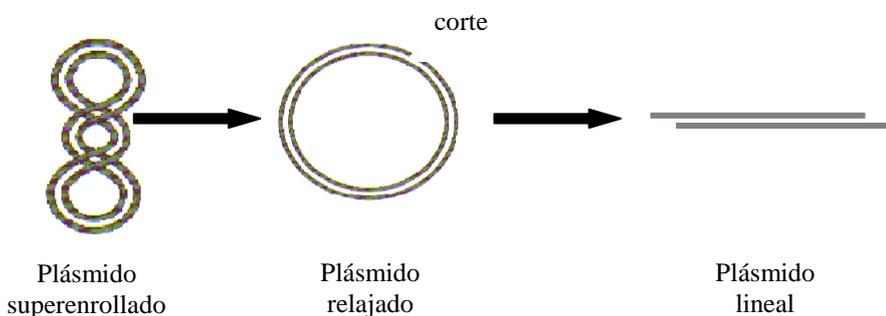


Figura 4.2: Esquema que representa la evolución de la estructura del plásmido pUC18 con el tiempo de irradiación en presencia de Ptr.

4.3.3.2 Fotosensibilización del plásmido PBR 322 por 6-carboxipterina

Recientemente, Ayling *et al*²⁰, confirmaron que por irradiación UV-A, la Cap produce cortes en la cadena de ADN. Sin embargo, proponen un mecanismo de reacción diferente. Como se vio anteriormente, Kawanishi *et al* postularon que la sensibilización de ADN por Cap transcurre a través de un mecanismo de transferencia de electrones. En contraposición, Ayling propone que no puede descartarse la participación del ¹O₂, basándose en que el agregado de azida sódica (secuestrador inespecífico de ¹O₂) al medio de reacción, inhibe la sensibilización.

4.4 Referencias

- 1 A. Albert, *Biochem. J.* **1953**, 54, 646-654
- 2 A. Albert, D. J. Brown, G. Cheeseman, *J. Chem. Soc.*, **1951**, 474
- 3 A. Albert, H. C. S. Wood, *J. Appl. Chem.*, **1952**, 2, 591
- 4 C. Lorente, A. H. Thomas, *Acc. Chem. Res.*, **2006**, 39, 395-402
- 5 A. H. Thomas, C. Lorente, A. L. Capparelli, M. R. Pokhrel, A. M. Braun, E. Oliveros, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, 1, 421-426
- 6 F. M. Cabrerizo, G. Petroselli, C. Lorente, A. L. Capparelli, A. H. Thomas, A. M. Braun, E. Oliveros, *Photochem. Photobiol.*, **2005**, 81, 1234-1240
- 7 C. Lorente, A. L. Capparelli, A. H. Thomas, A. M. Braun, E. Oliveros, *Photochem Photobiol Sci.*, **2004**, 3, 167-173
- 8 F. M. Cabrerizo, M. L. Dántola, A. H. Thomas, C. Lorente, A. M. Braun, E. Oliveros, A. L. Capparelli, *Chem. Biodiv.*, **2004**, 1, 1800-1811
- 9 F. M. Cabrerizo. "Propiedades Fotofísicas y Fotoquímicas de Pterinas en Solución Acuosa: Fluorescencia, Producción de Especies Reactivas de Oxígeno y Oxidación". Tesis Doctoral (**2005**)
- 10 R. Klein, I. Tatischeff, *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 45(1), 55-65
- 11 R. T. Parker, R. S. Freelander, E. M. Schulman, R. B. Dunlap, *Analytical Chem.*, **1979**, 51(12), 1921-1926
- 12 A. Momzikoff, R. Santus, *Océanis*, **1979-1980**, 5, 505-511
- 13 C. Lorente, "Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa" Tesis Doctoral (**2003**)
- 14 G. Petroselli, "Oxidación fotosensibilizada por pterina de nucleótidos purínicos en solución acuosa" Tesis Doctoral (**2008**)
- 15 G. Petroselli, R. Erra-Balsells, F. M. Cabrerizo, C. Lorente, A. L. Capparelli, A. M. Braun, E. Oliveros, A. H. Thomas, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2792-2799
- 16 G. Petroselli, M. L. Dántola, F. M. Cabrerizo, A. L. Capparelli, C. Lorente, E. Oliveros, A. H. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 3001-3011
- 17 K. Ito y S. Kawanishi, *Biochem.*, **1997**, 36, 1774-1781
- 18 K. Hirakawa, H. Suzuki, S. Oikawa y S. Kawanishi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2003**, 410, 261-268
- 19 C. Lorente, A. H. Thomas, L. S. Villata, D. Hozbor, A. Lagares, A. L. Capparelli, *Pteridines*, **2000**, 11, 100-105
- 20 T. Offer, B. N. Ames, S. W. Bailey, E. A. Sabens, M. Nozawa, J. E. Ayling, *FASEB J.*, **2007**, 21, 2101-2107

Capítulo 5

Preparación e irradiación de soluciones

La *irradiación continua* implica la iluminación de una muestra con luz proveniente de una lámpara de intensidad constante y durante períodos largos de tiempo. Esta última condición se refiere a la duración de la iluminación en las técnicas de fotólisis de destello, en las cuales el destello de luz puede durar desde el orden de los pocos milisegundos hasta el femtosegundo, de acuerdo a la técnica específica empleada. Los experimentos en los cuales se estudia una reacción fotoquímica inducida por irradiación continua se denominan genéricamente *fotólisis continuas o estacionarias*.

En este capítulo, se describirán las técnicas y los procedimientos que se emplearon para preparar e irradiar las soluciones acuosas en forma continua con radiación UV-B y UV-A. También se expone la técnica utilizada para medir la cantidad de radiación que alcanza la celda de reacción en un determinado período de tiempo.

5.1 Reactivos

La lumazina (Lum) usada en este trabajo de tesis fue provista por Laboratorios Shircks (Suiza), con una pureza superior al 98%, por lo que se utilizó sin purificación posterior.

Los nucleótidos empleados fueron 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP) y 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP) provistos por Sigma-Aldrich, con una pureza superior al 98 %.

Otros reactivos utilizados fueron: HCl, NaOH y H₂O₂ (30 %) provistos por Merck; Agua deuterada, D₂O (> 99,9 %, Euriso-top o Aldrich), hidróxido de sodio deuterado, NaOD (CEA, > 99 %) y ácido clorhídrico deuterado, DCl (Aldrich, 99,5 %). Enzima superóxido dismutasa de eritrocitos bovinos (SOD), Acetato de amonio (NH₄OAc), Trizma (C₄H₁₁NO₃ClH), Rodamina 123 (Rh123) y azul de tripano (TB) provistos por Sigma-Aldrich. Fosfato di ácido de potasio (KH₂PO₄) provisto por Anedra, metanol (MeOH) y acetonitrilo (ACN) provistos por J. T. Baker, yoduro de potasio (IK) provisto por Laboratorios Cicarelli y Bisulfato de quinina provisto por *Riedel-deHaen*.

El agua utilizada para preparar las distintas soluciones es calidad milliQ (agua destilada purificada en un equipo Milli Q Reagent Water System (resistividad ~ 10 MΩ cm⁻¹).

5.2 Preparación de soluciones

5.2.1 Soluciones en presencia de O₂

Las soluciones de Lum se prepararon disolviendo el sólido en agua libre de iones metálicos. Para favorecer la disolución se agregaron pequeños volúmenes (~ 10 – 100 µl) de NaOH 0,5 – 1 M. Como se mencionó anteriormente, en medio alcalino Lum presenta grupos ionizados, que hacen que su disolución esté más favorecida que en medio ácido. Posteriormente, se llevó a volumen final mediante el uso de matraces y se trasvasó la solución a frascos color caramelo para evitar la exposición a la luz.

Los nucleótidos son muy solubles en agua, por lo tanto, las soluciones se prepararon a pH neutro. Para dGMP ($\epsilon^{260} = 12180 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹, se compararon valores de concentración calculados por pesada o calculados a través del coeficiente de absorción molar y se obtuvieron valores similares, dentro del error experimental. Por lo tanto, se utilizó indistintamente cualquiera de los dos métodos. Por el contrario, en el caso de dAMP, dado que la droga se hidrata fácilmente, la concentración se calculó sólo utilizando la absorbancia de la solución preparada y su coeficiente de absorción molar a 260 nm ($\epsilon^{260} = 15060 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹

El pH de trabajo, al igual que la concentración de las soluciones, dependió básicamente del experimento en el cual serían empleadas. Las concentraciones de ácido y álcali utilizadas para llevar a pH variaron entre 0,1 y 2,0 M. Las soluciones de NaOH de distintas concentraciones se prepararon por pesada. Se empleó NaOH en granallas. Las soluciones resultantes no fueron tituladas, pues esta operación no es necesaria a los fines de este trabajo. Por su parte, se prepararon soluciones de HCl a partir de solución concentrada comercial. Las concentraciones de estas soluciones, fueron similares a las de NaOH y tampoco se titularon para conocer con mayor exactitud su concentración. Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro PHM220 (*Radiometer Copenhagen*) en combinación con un electrodo de pH pHC2011-8 (*Radiometer Analytical*). La calibración del mismo se realizó empleando soluciones amortiguadoras comerciales con valores de pH 4,00; 7,00 y 10,00 (Carlo Erba).

Para los experimentos de fotosensibilización, las mezclas entre soluciones de sensibilizador (Lum) y nucleótido se realizaron de dos formas. En algunos casos se mezclaron soluciones de Lum y nucleótido de igual pH y, en otros casos, se agregó el

nucleótido sólido a una solución de Lum de concentración y pH adecuados para el experimento a realizar. Antes de iniciar cada experimento se controló el pH y el espectro de absorción de la mezcla.

5.2.2 Soluciones en ausencia de O₂

Algunos experimentos se realizaron con soluciones libres de O₂. Para eliminar dicho gas se utilizaron celdas de cuarzo de 1cm x 1cm con tapa con cierre hermético, con un tapón de silicona (Figura 5.1). A través del tapón superior, se pincharon dos agujas; actuando, una como vía de entrada y otra como vía de salida. Mediante este dispositivo las soluciones fueron burbujeadas con un gas inerte (Ar o N₂) durante, al menos, 20 minutos. Luego, las aberturas fueron cubiertas con *parafilm*.

Durante el burbujeo, además de O₂, se elimina el CO₂ disuelto en la solución. El CO₂ en solución se encuentra en equilibrio con H₂CO₃, que está parcialmente dissociado. Por lo tanto, al eliminarse el CO₂, los equilibrios de las reacciones 1 a 3 se desplazan hacia la izquierda consumiéndose protones. En consecuencia, la solución se alcaliniza ligeramente. Debido a esto, se registraron los espectros de absorción de las soluciones antes y después de burbujear para controlar que se mantenga la forma ácido-base de Lum deseada para el experimento a realizar.



Por otro lado, los gases inertes están libres de H₂O, por lo que el burbujeo de la solución provoca la pérdida de cierta cantidad de H₂O. En consecuencia, burbujeos prolongados e intensos pueden producir una eliminación apreciable de solvente concentrando la muestra. El control espectral de las soluciones antes y después del burbujeo sirve, además, para detectar cambios en la concentración de la muestra.

5.2.3 Soluciones en agua deuterada

En algunos estudios, especialmente aquellos relacionados con oxígeno singlete (¹O₂), se utilizó agua deuterada (D₂O) en lugar de H₂O como solvente. Las soluciones en D₂O se prepararon disolviendo los compuestos en pequeños volúmenes de solvente. Este

procedimiento permite disminuir el gasto de solvente empleado en los distintos experimentos, que en el caso de D₂O, es muy costoso. Debido a la escasa masa empleada, el sólido no puede pesarse previamente. Por consiguiente, las concentraciones se calcularon midiendo la absorbancia de las soluciones y empleando los correspondientes valores de ϵ . Previamente, se controló que los espectros de absorción y los ϵ sean iguales en ambos solventes.

El pD ($-\log [D^+]$) fue medido con el mismo pH-metro que el usado para las soluciones en H₂O. Los valores de pD se calcularon aplicando la siguiente corrección a cada medida²:

$$pD = pH + 0,4 \quad (4)$$

donde pH es el valor leído en el pH-metro. El pD fue ajustado mediante el agregado de pequeños volúmenes, con micropipeta, de soluciones en D₂O relativamente concentradas de NaOD y DCl.

5.2.4 Soluciones con secuestradores selectivos

Se realizaron experimentos de irradiación continua variando las condiciones experimentales. Un caso particular que merece comentarse brevemente consistió en el agregado de sustancias que modifican la concentración de un estado excitado en particular o de un intermediario de reacción.

Para estudiar la posible participación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en el mecanismo de las reacciones estudiadas en este trabajo, se irradiaron soluciones en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima cataliza la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ en H₂O₂ y O₂, eliminándolo del medio de reacción:



Se realizaron experimentos de irradiación estacionaria, con y sin enzima (control), y se compararon las velocidades iniciales de reacción. Para la preparación de las soluciones con enzima, se tomó una alícuota de la solución control y se le agregó la masa de enzima requerida para cada experimento particular. Dicha masa, corresponde a una cierta actividad enzimática por unidad de volumen.

La velocidad puede ser la misma, con y sin enzima, si el $O_2^{\bullet-}$ no está involucrado en el proceso. Por el contrario, si el $O_2^{\bullet-}$ participa en el proceso, la velocidad se ve afectada en los experimentos con enzima respecto a los experimentos control.

Algunos iones inorgánicos actúan como desactivadores de estados excitados de moléculas orgánicas, en un fenómeno que se conoce como efecto del átomo pesado.³ En este trabajo, se utilizó el anión yoduro para desactivar estados excitados. Para ello se adicionó yoduro de potasio (KI) a las soluciones a irradiar, y se compararon las velocidades iniciales de consumo de reactivos y formación de productos en presencia y ausencia de dicho anión. La elección de las concentraciones empleadas y el efecto concreto sobre los distintos estados excitados serán discutidos en el Capítulo 9.

5.3 Determinación del coeficiente de absorción molar

Para determinar cuantitativamente la concentración de una solución midiendo la cantidad de luz que ésta transmite, se necesita una relación entre la concentración de la solución y su transmisión de luz. Dicha relación está dada por la ley de Lambert-Beer. Esta ley es una modificación de la deducida por Lambert que se aplica a la transmisión de luz monocromática por sólidos homogéneos, y que, adaptada a soluciones, puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) l C \quad (6)$$

donde $A(\lambda)$ es la absorbancia de la solución a una longitud de onda dada, l el camino atravesado por la radiación, C la concentración de la sustancia estudiada y $\varepsilon(\lambda)$ el coeficiente de absorción molar a la misma longitud de onda, el cual es una constante característica de la sustancia absorbente y de la longitud de onda utilizada. ε se expresa preferentemente en $M^{-1}cm^{-1}$, sin embargo, alternativamente se puede utilizar con unidades de cm^2mol^{-1} indicando que este coeficiente es una sección transversal molar para absorción.⁴ Cuanto mayor es la misma, mayor es la atenuación de la intensidad del haz.

Para determinar los valores de ε de los compuestos estudiados se procedió de la siguiente manera:

- (i) se pesó una cierta cantidad de sólido en una balanza analítica electrónica. La masa pesada fue mayor a 1mg para minimizar el error.
- (ii) se disolvió el sólido en agua y se llevó a volumen en un matraz.

- (iii) utilizando HCl y/o NaOH se llevó a pH. El volumen agregado de álcali o ácido se consideró para calcular la nueva concentración de la solución.
- (iv) se tomó un espectro de absorción de la solución en una celda de camino óptico conocido. En todos los casos se eligieron condiciones tales que la absorbancia medida estuviera comprendida entre 0,1 y 1; intervalo para el cual los errores en la determinación de la absorbancia son menores.
- (v) con el valor de la absorbancia a la longitud de onda de interés, el camino óptico (l) y la concentración (C) calculada por pesada se utilizó la ley de Lambert-Beer (Ecuación 5) para obtener el ϵ de cada compuesto a un determinado pH y longitud de onda.

5.4 Irradiación y análisis de soluciones

Para la irradiación de las soluciones se utilizaron dos tipos de lámparas; en la mayoría de los experimentos se utilizaron lámparas *Rayonet Photochemical Reactor Lamp*, RPR 3500 A y RPR 3000 A, fabricadas por la empresa *Southern N. E. Ultraviolet Co*; y sólo en algunos casos se utilizó una lámpara de Xe-Hg Osram de 1 kW.

5.4.1 Irradiación con lámparas *Rayonet*

Estas lámparas emiten radiación de 350 ó 300 nm, respectivamente, con un ancho de banda a la mitad del máximo de emisión de la lámpara (FWHM, de *full width at half maximum*)⁴ aproximado de 20 nm. En la Figura 5.1 se muestra un esquema del dispositivo empleado para la irradiación de las soluciones. Dicho dispositivo se ubicó en una “caja negra”, la cual evita el ingreso de luz proveniente desde el exterior.

Las soluciones contenidas en las celdas se homogeneizaron usando un agitador magnético (VARIOMAG, *electronicrührer, Telemodul*). De esta manera se logró una mejor distribución de los reactivos y fotoproductos en el seno de la solución, evitando la acumulación de estos últimos en la zona cercana a la cara irradiada de la celda. El tiempo de irradiación fue medido con un cronómetro de disparo manual a partir del instante en que se enciende la lámpara. La geometría del dispositivo se mantuvo sin modificaciones dentro de cada experimento. Además, se mantuvo invariable la posición relativa de la celda respecto de la lámpara entre distintos experimentos de fotólisis. Esto permitió una comparación directa entre resultados de distintos experimentos.

Particularmente en los experimentos de fotosensibilización de nucleótidos, en los cuales se empleó la lámpara de 300 nm, se utilizó un filtro de corte (≤ 300 nm) dispuesto entre la celda y la lámpara (Figura 5.1), con el objeto de asegurar que la radiación que llega a la muestra es de λ mayor a 300 nm y así estar seguros que el nucleótido no se verá afectado.

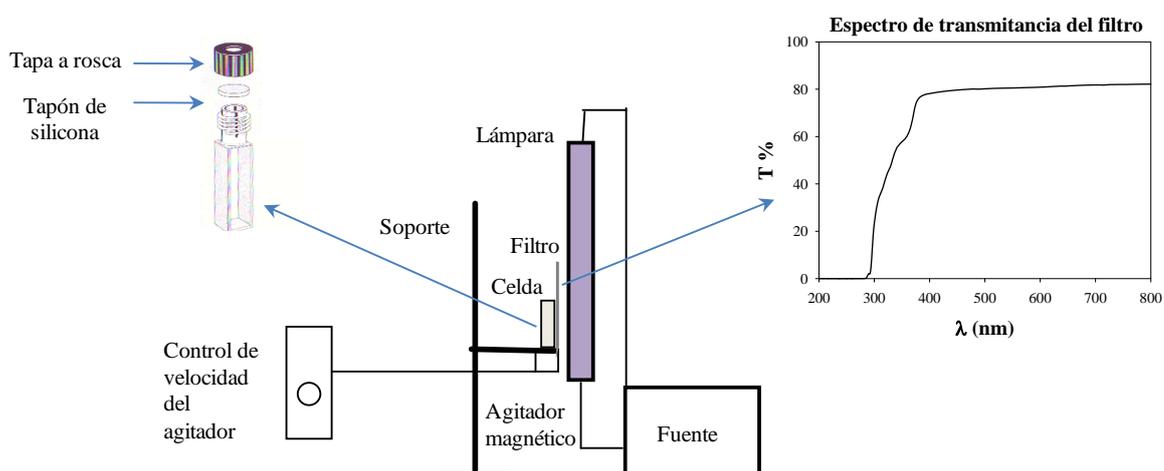


Figura 5.1: Esquema del dispositivo y celdas empleados para realizar los experimentos de irradiación continua.

5.4.2 Irradiación con lámpara de Xe-Hg

En este caso, para la irradiación de las soluciones, se utilizó una lámpara de excitación Xe/Hg Osram de 1 kW. El haz de luz pasa a través de un filtro de agua y un monocromador ISA Jobin-Yvon B204, de 6 nm de ancho de banda, antes de incidir en la celda que contiene la muestra. La longitud de onda de excitación utilizada fue 312 nm, la cual se eligió considerando la longitud de onda del máximo de absorción de la banda de menor energía de Lum (a pH ácido) y la longitud de onda de la máxima emisión de la lámpara en esta región del espectro.

5.4.3 Metodología general para el análisis de soluciones

En cada experimento de fotólisis, se extrajeron muestras a distintos tiempos de irradiación para su posterior análisis. Con este fin se adoptaron dos procedimientos generales:

- Medidas realizadas sobre la misma alícuota de solución original: se introduce la solución en la celda, se la irradia durante un cierto tiempo, se apaga la lámpara y se realiza

la medida. Posteriormente se vuelve a encender la lámpara, se irradia la muestra durante otro período, etc. Se procede así, irradiando y analizando sucesivamente la solución sin sacarla de la celda. Se procedió de esta manera en los estudios espectrofotométricos de las reacciones y en las determinaciones electroquímicas de O₂. En este último caso, como se verá más adelante, no es necesario interrumpir la iluminación de la muestra.

- Medidas realizadas sobre distintas alícuotas de la solución original: se introduce una alícuota de la solución en la celda, se irradia durante un tiempo y se retira la totalidad de la muestra para ser procesada. Se vuelve a cargar la celda con solución fresca y se repite la operación irradiando un tiempo distinto esta vez, o el mismo tiempo si lo que se quiere es realizar un duplicado. Este procedimiento se empleó para análisis cromatográfico de las soluciones (HPLC), medidas de H₂O₂ y análisis de productos por espectrometría de masas.

5.5 Determinación del rendimiento cuántico de una reacción

Si se tiene una solución en la cual la única especie química que absorbe radiación, a determinada λ , es un soluto, la ley de Lambert-Beer puede expresarse, con la siguiente ecuación:

$$q_{p,\lambda} = q_{p,\lambda}^0 (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda)lC}) \quad (7)$$

donde $q_{p,\lambda}$ es la intensidad de la luz absorbida por el soluto que se encuentra en la solución con una concentración molar C a una longitud de onda λ , $q_{p,\lambda}^0$ es la intensidad de la luz incidente, $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de absorción molar a la misma λ y l es el camino óptico. $q_{p,\lambda}$ y $q_{p,\lambda}^0$ se expresan en fotones por unidad de tiempo.

En fotoquímica es útil un parámetro que puede definirse como el número de fotones por unidad de tiempo y por unidad de volumen que son absorbidos por una muestra y que se representará como $q_{p,\lambda}^v$. Si V es el volumen de la solución, la relación entre $q_{p,\lambda}$ y $q_{p,\lambda}^v$ viene dada por la siguiente ecuación:

$$q_{p,\lambda}^v = q_{p,\lambda} / V \quad (8)$$

El *rendimiento cuántico de una reacción fotoquímica* puede ser definido como el número de moléculas que reaccionan por cada fotón absorbido. Este parámetro será representado por la letra (Φ).

Si se mide la velocidad de desaparición de un reactivo o la velocidad de aparición

de un producto puede calcularse el rendimiento cuántico de una reacción mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Phi_{(\lambda)R} = \frac{-d[R]/dt}{q_{p,\lambda}^v} \quad (9)$$

$$\Phi_{(\lambda)P} = \frac{d[P]/dt}{q_{p,\lambda}^v} \quad (10)$$

Las velocidades $d[R]/dt$ y $d[P]/dt$ se calculan a partir de la determinación de las concentraciones de reactivo y productos realizadas con la técnica HPLC o espectrofotometría, según el caso. El otro parámetro que es necesario determinar es $q_{p,\lambda}^v$, para lo cual es imprescindible conocer $q_{p,\lambda}^0$ ó $q_{p,\lambda}^{0,v}$, la intensidad de luz incidente por unidad de volumen ($q_{p,\lambda}^0 / V$). La metodología empleada para la determinación de este último parámetro se discutirá en la siguiente sección. Por otro lado, resulta obvio que $q_{p,\lambda}^0$ depende de factores geométricos, tales como la distancia de la lámpara a la celda, las dimensiones de la celda misma, etc. Por esta razón en todos los experimentos en los cuales se empleó el valor de $q_{p,\lambda}^0$ para realizar cálculos, la geometría del sistema se mantuvo igual a la del experimento de actinometría.

Para la determinación de los rendimientos cuánticos de una determinada reacción se puede trabajar en dos condiciones diferentes:

- condiciones de absorción total de luz. De esta manera, conociendo el $\epsilon(\lambda)$ de la sustancia que se va a irradiar a la λ_{exc} , se trabaja en condiciones experimentales tales que $A(\lambda) = \epsilon(\lambda) l C \gg 1$, lo que conduce a que, según la Ecuación (7), $q_{p,\lambda} \cong q_{p,\lambda}^0$. Bajo estas condiciones $q_{p,\lambda}^v$ puede reemplazarse por $q_{p,\lambda}^{0,v}$ en las Ecuaciones (9) y (10).
- condiciones donde no es posible trabajar con absorción total de luz. Para este caso no es posible aplicar la aproximación que $q_{p,\lambda} \cong q_{p,\lambda}^0$.

Para obtener las velocidades de consumo de reactivo o formación de productos, se tomaron intervalos de tiempo en los cuales se cumplieran dos condiciones. Por un lado, que la absorbancia del reactivo no cambie significativamente en el intervalo de trabajo, con esto se pretende que la cantidad de luz absorbida por unidad de tiempo sea aproximadamente constante. Por otro lado, que la absorbancia de los productos a la λ_{exc} sea despreciable respecto a la del reactivo. Esta condición asegura que pueda considerarse que la luz absorbida por la solución es la luz absorbida sólo por el reactivo, siendo válida la Ecuación (7). Puede concluirse rápidamente que estas dos condiciones no son independientes sino que, por el contrario están fuertemente relacionadas.

Cuando un determinado experimento de fotólisis avanza, el reactivo se consume a la vez que los fotoproductos se acumulan. Esto conduce a que, luego de un cierto tiempo de irradiación, las condiciones previamente establecidas dejen de cumplirse. Cuando esto ocurre, en general, se observa una disminución en la velocidad de consumo de reactivo y una disminución en la formación de los productos que son fotoestables (o menos fotosensibles que el reactivo).

Para concluir, los experimentos en los cuales se determinaron los rendimientos cuánticos de las distintas reacciones estudiadas fueron diseñados de tal manera que el período en el cual se cumplen las condiciones previamente mencionadas, fuera lo suficientemente largo como para poder realizar un número adecuado de medidas de concentración.

5.6 Actinometrías

La determinación de la intensidad de la radiación incidente en la celda de reacción ($q_{p,\lambda}^0$) se realizó mediante el empleo de diferentes actinómetros químicos, dependiendo de la naturaleza de la lámpara utilizada:

(i) En el caso de la lámpara *Rayonet* 3500 A. La intensidad de la radiación se midió con un actinómetro que tiene una banda de absorción que se solapa con la emisión de la lámpara. En este trabajo, se utilizó el actinómetro *Aberchrome 540* (Aberchromics Ltd.).⁵ Los intervalos de longitudes de onda de aplicación de este actinómetro son de 310 a 370 nm y de 436 a 546 nm.

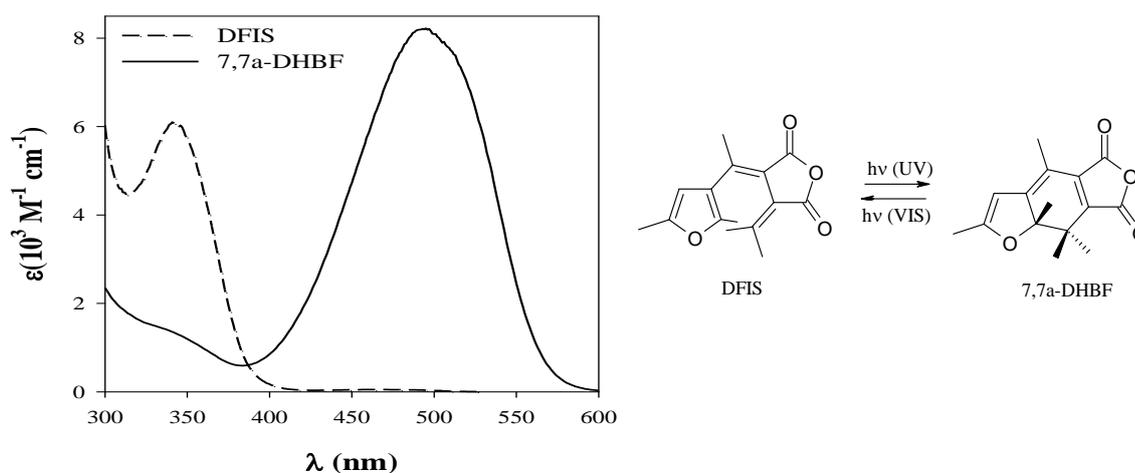


Figura 5.2: Estructura química y espectros de absorción en tolueno de los dos isómeros del *Aberchrome 540*. La reacción hacia la derecha se logra irradiando en el intervalo 310-370 nm y hacia la izquierda irradiando entre 436-546 nm.

El *Aberchrome 540* es el anhídrido del ácido (E) α -(2,5-dimetil-3-furiletiliden) (isopropiliden) succínico (DFIS), el cual bajo irradiación con radiación comprendida en el primer intervalo adquiere un color rojo intenso debido a la formación del 7,7a-dihidro-2,4,7,7a-pentametilbenzo[b]furano (7,7a-DHBF). Si se excita este producto, ahora irradiando en el segundo intervalo, esta reacción ocurre en sentido inverso. Las estructuras químicas de las dos especies, junto con los correspondientes espectros de absorción, se muestran en la Figura 5.2.

Para realizar la actinometría en el ultravioleta, se prepara una solución de DFIS a partir del sólido, se irradia a distintos tiempos y se sigue la absorbancia del 7,7a-DHBF a la longitud de onda de su máximo (A^{494}) en función del tiempo. Análogamente, cuando se trabaja en el visible, se irradia 7,7a-DHBF a distintos tiempos y el análisis se hace también midiendo A^{494} . Sin embargo, en este caso, antes de comenzar la actinometría debe generarse el isómero 7,7a-DHBF. Para ello, previamente se prepara una solución de DFIS y se la irradia en el UV (310-370) hasta generar una concentración de 7,7a-DHBF adecuada (ver más adelante). La intensidad de luz absorbida por el actinómetro ($q_{p,\lambda}^v$) puede calcularse a partir de la siguiente ecuación:

$$q_{p,\lambda}^v = \frac{d[7,7a-DHBF]}{dt} \frac{1}{\Phi_{Ac}} \quad (11)$$

donde, Φ_{Ac} es el rendimiento cuántico del actinómetro. Cuando se irradia en el UV, Φ_{Ac} es el rendimiento cuántico de la reacción de conversión de DFIS en 7,7a-DHBF (Φ_{UV}) y es igual a 0,2 independientemente del solvente usado. Cuando se irradia en el visible, Φ_{Ac} es el rendimiento cuántico de la conversión de 7,7a-DHBF en DFIS (Φ_{Vis}). Φ_{Vis} ha sido determinado en tolueno, y varía linealmente en función de la longitud de onda de irradiación entre 436 nm y 546 nm, de acuerdo con la ecuación:

$$\Phi_{Vis} = 0,210 - 3,06 \cdot 10^{-4} \lambda \quad (12)$$

donde λ debe expresarse en nm.³

De acuerdo a la ecuación de Lambert-Beer:

$$[7,7a-DHBF] = A^{494} / \epsilon_{494} l \quad (13)$$

Por consiguiente, la Ecuación (11) puede expresarse de la siguiente manera:

$$q_{p,\lambda}^v = (dA^{494} / dt) / (\epsilon_{494} \cdot l \cdot \Phi_{Ac}) \quad (14)$$

donde, $\epsilon_{494} = 8200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (en tolueno), y l es el camino óptico de la celda en la cual se mide la absorbancia ($l = 1 \text{ cm}$).

Para determinar $q_{p,\lambda}^v$, en el intervalo 310-370, se cargó la celda de fotólisis con el actinómetro y se irradió esta solución durante un cierto tiempo y se midió el valor de absorbancia a 494 nm. Se repitió este procedimiento de manera de obtener varios puntos. Se graficó A^{494} vs t , se realizó una regresión lineal y se obtuvo la pendiente de la correspondiente recta. Posteriormente se calculó $q_{p,\lambda}^v$ usando la Ecuación (14). En la Figura 5.3 se muestran los espectros de absorción obtenidos al irradiar el actinómetro a 350 nm.

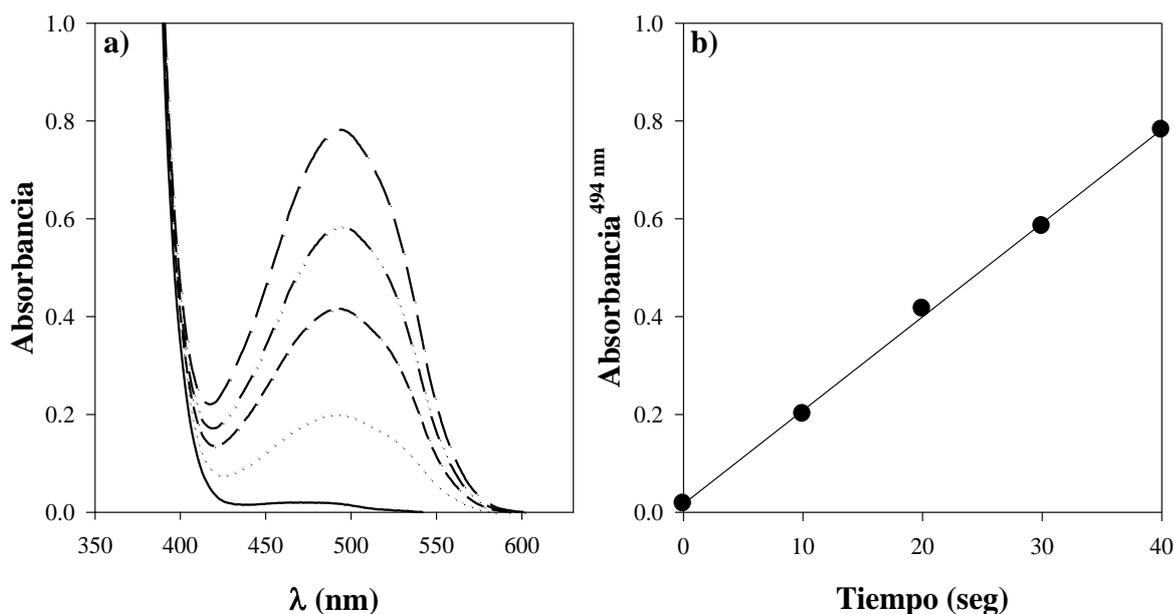


Figura 5.3: a) Evolución de los espectros de absorción de una solución de *Aberchrome 540* irradiada a 350 nm (0, 10, 20, 30 y 40 s); camino óptico = 1cm. b) Variación de la absorbancia a 494 nm en función del tiempo de irradiación.

Para realizar una actinometría en el visible, primero se irradia DFIS para generar 7,7a-DHBF hasta lograr que la absorbancia de este último a la longitud de onda que se quiere medir sea alta ($A > 3$). La ecuación de Lambert-Beer pierde linealidad a absorbancias tan altas, por lo tanto, es necesario registrar la absorbancia utilizando una celda de menor camino óptico. Luego se irradia en el visible y se grafica la disminución de

la absorbancia a 494 nm en función del tiempo (Figura 5.4). El resto del análisis es igual al explicado anteriormente, con la única salvedad que al valor de dA^{494}/dt hay que multiplicarlo por (-1) porque en este caso es negativo.

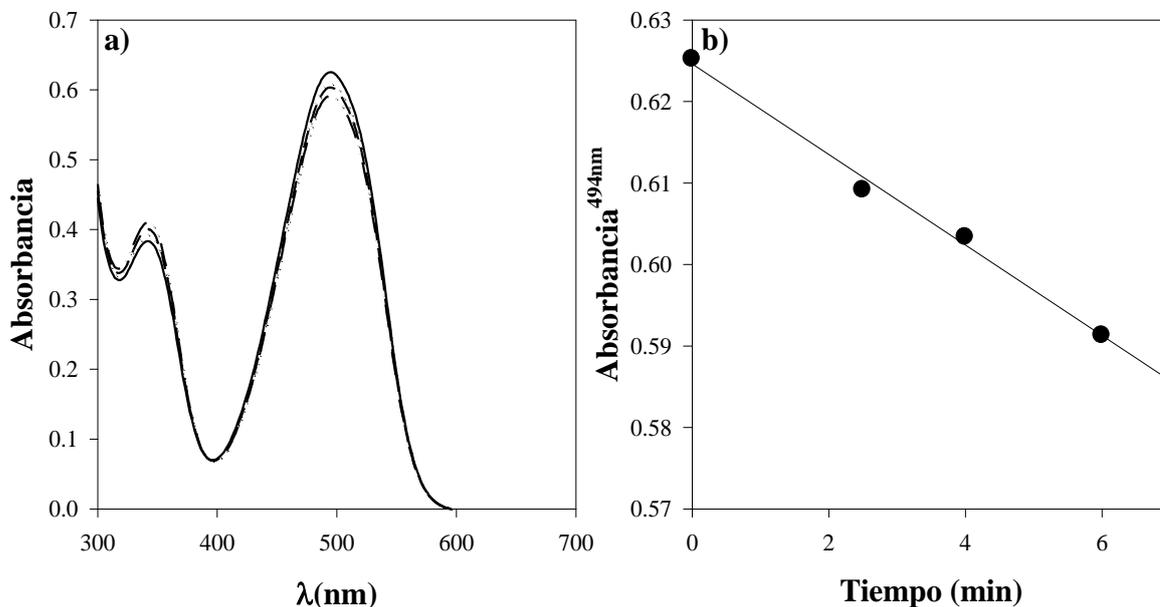
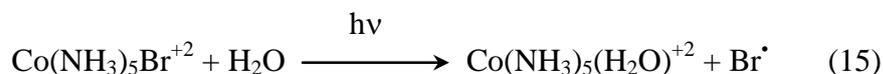


Figura 5.4: a) Evolución de los espectros de absorción de una solución de *Aberchrome 540* irradiada a 547 nm (0; 2,5; 4 y 6 min). En este caso se irradió en celda de camino óptico = 1 cm, pero se registraron los espectros en celda de 0,1 cm. b) Variación de la absorbancia a 494 nm en función del tiempo de irradiación.

(ii) En el caso de la lámpara Rayonet 3000 A se utilizó como actinómetro una solución de $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Br}]\text{Br}_2$, preparada en NaBr 0,01 M y HClO_4 0,01 M para evitar la hidrólisis. El complejo de Co(III) presente en este compuesto sufre la siguiente reacción al ser irradiado.⁶



El $\text{Co}(\text{NH}_3)_5(\text{H}_2\text{O})^{+2}$ formado posteriormente se descompone al correspondiente hexaacuocomplejo de Co(II) cuya concentración puede determinarse espectrofotométricamente formando un complejo con el anión SCN^- . El rendimiento cuántico para la foto-reducción del complejo de Co(III) (Φ_{Co}) es 0,314 a 300 nm.⁷

Se cargó la celda donde luego se realizarían las fotólisis con el actinómetro y se irradió esta solución durante un cierto tiempo t . Posteriormente se determinó la concentración de Co(II) y se calculó $q_{p,\lambda}^v$ con la siguiente relación que puede derivarse de

la Ecuación (9):

$$q_{p,\lambda}^v = \frac{d[\text{Co(II)}]}{dt} \frac{1}{\Phi_{\text{Co}}} \quad (16)$$

Si más del 99,9% de la luz es absorbida por el actinómetro durante el período de tiempo de la irradiación, puede suponerse que $q_{p,\lambda}^v$ es aproximadamente igual a $q_{p,\lambda}^{0,v}$ ($q_{p,\lambda}^{0,v} \approx q_{p,\lambda}^v$). De lo contrario, se realiza el cálculo correspondiente empleando la Ecuación (7), siendo $q_{p,\lambda}^v$ la intensidad de la luz absorbida por el actinómetro que se encuentra en la solución con una concentración molar C , $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de absorción molar a la longitud de onda de irradiación y l es el camino óptico.

5.7 Referencias

-
- 1 M. J. Cavaluzzi, P. N. Borer, *Nucleic Acid Research*, **2004**, 32(1), e13
 - 2 P. Salomaa, L. L. Schaleger, F. A. Long, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 1-7
 - 3 G. De Guidi, S. Giuffrida, G. Condorelli, L. L. Costanzo, P. Miano, S. Sortino; *Photochem. Photobiol.*, **1996**, 63(4), 455-462
 - 4 S. E. Braslavsky, *Pure Appl. Chem.*, **2007**, 79(3), 293-465
 - 5 A. M. Braun, M. T. Maurette, E. Oliveros, "Photochemical Technology", chapter 2 (Translated by D. Ollis and N. Serpone) J. Wiley & Sons, Chichester (**1991**).
 - 6 G. J. Ferraudi "Elements of Inorganic Photochemistry"; John Wiley & Sons, Inc (**1988**)
 - 7 J. F. Endicott, G. J. Ferraudi, J. R. Barber, *J. Phys. Chem.*, **1975**, 79, 630

Capítulo 6

Análisis de soluciones irradiadas

Para seguir la evolución de los procesos fotoquímicos estudiados en el presente trabajo de tesis las soluciones sometidas a irradiación continua según lo expuesto en el capítulo anterior, fueron analizadas empleando cinco técnicas diferentes: espectrofotometría UV-visible, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectrometría de masa por ionización *electrospray* (ESI-MS), determinación colorimétrica de H₂O₂ y medida electroquímica del O₂ disuelto. Este conjunto de técnicas fue utilizado en la identificación, caracterización y cuantificación de reactivos y productos de reacción, como así también para obtener información sobre los mecanismos de reacción involucrados.

6.1 Espectrofotometría UV-visible

Un espectro de absorción es un registro de la intensidad de la absorción de luz por una muestra en función de la longitud de onda (o frecuencia) de la radiación incidente. Éste muestra qué longitudes de onda (λ) son absorbidas por la molécula en estudio al pasar de niveles electrónicos de menor a mayor energía. Las bandas observadas dan información sobre las diferencias energéticas entre el estado electrónico fundamental de una molécula y sus correspondientes estados excitados. Si bien un espectro de absorción UV-visible no proporciona información clara para identificar y caracterizar un compuesto particular, es cierto que esta técnica es muy útil para observar y analizar cambios en los grupos funcionales del mismo. Por ejemplo, las distintas formas ácido-base de una misma sustancia pueden claramente ser distinguidas por las diferencias en sus espectros de absorción.

En este trabajo de tesis, los espectros de absorción UV-visible se obtuvieron con espectrofotómetros *Cary 3* (Varian), HP 8453 y HP 8452A (Hewlett Packard) y Shimadzu UV-1800. En todos los casos, son equipos que permiten obtener espectros en el intervalo de λ comprendido entre 190 y 900 nm. Los equipos *Cary 3* y Shimadzu utilizados, son espectrofotómetros de barrido de doble haz de alta sensibilidad mientras que los HP son espectrofotómetros con detección por arreglo de diodos de simple haz. Estos últimos son menos sensibles y precisos que los primeros, pero tienen la ventaja de ser muy rápidos. En todos los casos, son equipos provistos de programas adecuados para registrar y almacenar

los espectros. Estos programas también promedian señales que permiten suavizar los espectros cuando la relación señal/ruido es desfavorable.

6.1.1 Análisis de las soluciones irradiadas

Los espectros de absorción de las soluciones irradiadas, se registraron en celdas de cuarzo, *Quartz suprasil*, (Hellma) a distintos intervalos de tiempos, utilizando H₂O como blanco. Se emplearon celdas de camino óptico 0,4 ó 1 cm, según la concentración de la muestra bajo análisis. El análisis espectral permite una primera aproximación al comportamiento fotoquímico de un determinado compuesto. Por ejemplo, la detección de cambios espectrales luego de la irradiación de la muestra demuestra unívocamente que se produjo una transformación fotoquímica. Por el contrario si el espectro de absorción no cambia como consecuencia de la irradiación, muy probablemente el compuesto sea fotoestable.

Con los datos obtenidos por esta técnica se realizaron gráficas de absorbancia vs tiempo para distintas λ . El análisis de estas gráficas permite evaluar algunos aspectos cinéticos del proceso estudiado.

Por otro lado, a partir de los espectros de absorción registrados a distintos tiempos de irradiación se calcularon los espectros diferencia experimentales (llamados de ahora en adelante EDE), donde a cada espectro absoluto obtenido durante la fotólisis ($E(t = t_n)$) se le restó el espectro absoluto obtenido a tiempo "cero" ($E(t = 0)$). Por lo que para una reacción determinada se obtiene un EDE por cada tiempo distinto de cero en el que fue analizada la solución ($EDE(t = t_n)$, con $n = 1, 2, 3, \dots$). En este análisis se prestó especial atención a la presencia y permanencia a lo largo del tiempo de puntos isobéuticos (zonas del espectro donde el coeficiente de absorción molar (ϵ) de los reactivos y productos de la reacción son iguales). El hecho de que estos puntos isobéuticos se mantengan constantes con el tiempo de irradiación indica la presencia de un único proceso químico, entendiéndose por tal, una única reacción o varias simultáneas, pero con proporciones de los distintos productos constantes.

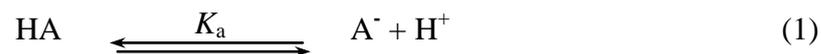
Este tipo de análisis es muy útil para evaluar, por ejemplo, en qué momento las reacciones de fotólisis secundaria se vuelven importantes. Así, con esta información se puede poner límite al tiempo de irradiación dentro del cual se hará el análisis espectrofotométrico o donde se aplicarán otras técnicas en las cuales se desea aislar el

primer proceso fotoquímico.

Por otra parte, al dividir la absorbancia de cada EDE a cada λ por un número elegido arbitrariamente según la conveniencia en cada caso, se obtienen los denominados espectros diferencia normalizados (EDEN). En este trabajo, los espectros diferencia fueron normalizados dividiendo por la absorbancia a la longitud de onda donde se observan los mayores cambios espectrales. Si en un período de tiempo, durante una fotólisis, se tiene un único proceso, dentro del error experimental, los EDEN a distintos tiempos serán iguales. Por el contrario, serán diferentes si existe más de un proceso. Este es un criterio adicional que se aplicó también para determinar durante cuánto tiempo, dentro de un experimento, podía considerarse la existencia de un único proceso fotoquímico.

6.1.2 Titulación espectrofotométrica

Existen diferentes métodos analíticos diseñados para el estudio de los equilibrios ácido-base y la determinación de sus respectivas constantes de disociación ácida (K_a), entre los que se destaca la titulación espectrofotométrica. Este método se basa, principalmente, en el análisis de la variación del espectro de absorción de una solución de la sustancia estudiada cuando se cambia el pH de la misma, sin alterar su concentración.^{1,2,3} El equilibrio ácido-base que presenta Lum (Capítulo 9) queda representado por la siguiente reacción:



donde HA representa a la forma ácida y A^- a la forma alcalina de Lum; y K_a es la constante de equilibrio de esta reacción o constante de disociación ácida. Dicha constante K_a viene dada por la siguiente expresión:

$$K_a = [\text{H}^+] [\text{A}^-] / [\text{HA}] \quad (2)$$

En base a consideraciones generales de cualquier equilibrio entre dos formas ácido-base de una sustancia, puede deducirse una ecuación que vincula la absorbancia de la solución, a una determinada λ , con el pH:

$$A_{(\lambda)} = C_i \{ b + (a - b) [K_a / (K_a + 10^{(-X)})] \} \quad (3)$$

donde $A_{(\lambda)}$ es la absorbancia de la solución a una λ determinada, C_i es la concentración inicial de la solución, a y b son los coeficientes de absorción molar a dicha λ de las formas alcalina y ácida, respectivamente, K_a es la constante de ionización del compuesto y X el pH. En el presente trabajo de tesis se determinó, empleando este método, el valor de K_a de Lum, valor imprescindible de conocer para llevar a cabo distintos tipos de estudios en solución acuosa.

En particular, se preparó una solución acuosa de Lum de concentración conocida (solución madre) siguiendo, para tal fin, el procedimiento detallado en el Capítulo 5. La concentración de esta solución madre se ajustó de manera tal que la absorbancia de las mismas fuera adecuada para realizar las medidas espectrofotométricas (típicamente, valores de absorbancia inferiores a 1,5). Esta solución se dividió en dos fracciones, una de las cuales se llevó a pH 12 y la otra a pH 4, mediante el agregado de pequeños volúmenes (μl) de solución acuosa de NaOH y HCl, respectivamente (Capítulo 5). En todos los casos el volumen agregado (empleando micropipetas) fue menor al 0,5 % del volumen de la alícuota, con lo cual, puede considerarse que el aumento del volumen, al fijar el pH de la solución, es despreciable y, por ende, la concentración no varía respecto a la solución madre. Luego se realizó una mezcla de ambas soluciones en proporciones definidas, para ir ajustando el pH final a un valor deseado. Una vez alcanzado el pH de interés se tomó el espectro de absorción de la solución. Repitiendo este procedimiento, se prepararon alícuotas de diferentes pH, a cada una de las cuales se le registró el espectro de absorción. De esta manera, mediante la mezcla de las soluciones madre de distinto pH en distintas proporciones, se logra modificar el pH de la solución en un amplio intervalo, sin modificar la concentración de la sustancia cuya K_a se quiere determinar.

Posteriormente, se graficaron los espectros de absorción obtenidos y se analizó la presencia de puntos isobésticos con el fin de evaluar la cantidad de formas ácido-base presentes en el intervalo de pH estudiado. Se realizaron gráficos de absorbancia en función del pH, a distintas λ . Para reducir posibles fuentes de error, se escogieron, para el análisis, valores de λ correspondientes a las zonas de mayor cambio de absorbancia. Sobre la base de los resultados experimentales, se realizó el ajuste no lineal empleando la ecuación 3, que permitió obtener los valores de los parámetros a , b y K_a .

6.2 Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento

La técnica de cromatografía se basa en el principio general de distribución de un compuesto entre dos fases, una fija y otra móvil. Si bien existen diferentes variantes de cromatografía, en esta sección se describirá la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (*High performance liquid chromatography* o HPLC). Esta técnica posee una mayor eficiencia separativa comparada con otras técnicas cromatográficas, tales como cromatografías en capa fina. Considerando que los sistemas analizados en este trabajo son complejos y consisten en soluciones conteniendo diversos solutos, esta cualidad adquiere gran importancia. Además, este método permite cuantificar un determinado compuesto si se cuenta con el patrón correspondiente, siendo esto sumamente útil para calcular rendimientos cuánticos. En este trabajo de tesis se utilizó esta técnica fundamentalmente para obtener los perfiles de concentración de consumo de reactivo y formación de productos que tienen lugar a lo largo de una reacción. Para estas medidas se empleó un equipo *Shimadzu Prominence LC-20A*, que en adelante llamaremos HPLC-1 (Figura 6.1). Este equipo cuenta con un módulo de distribución de solventes (LC-20AT), un degasificador *on line* (DGU-20A5), un módulo controlador (CBM-20), un *auto sampler* (SIL-20A HT), un horno (CTO-10AS-VP) y un sistema de detección formado por un detector con arreglo de diodos UV/vis (SPD-M20A). Este sistema de detección permite hacer un monitoreo a todas las λ entre 200 y 800 nm. El equipo posee un software (*LC solution*) que permite registrar y analizar los espectros de absorción de cada uno de los productos.

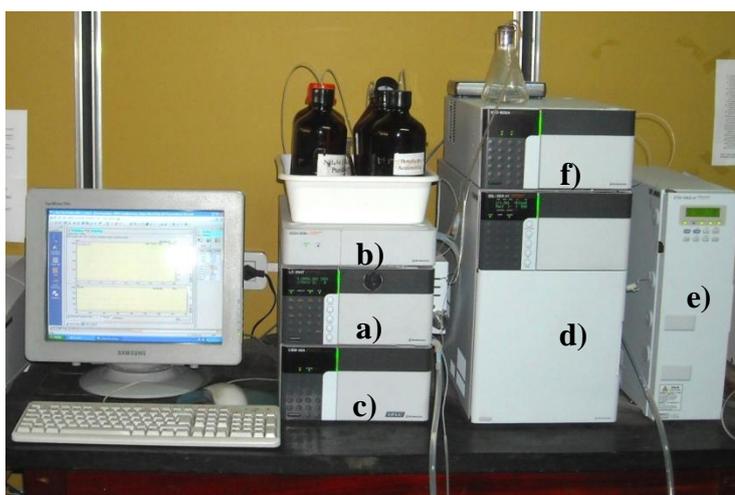


Figura 6.1: fotografía del equipo HPLC utilizado. a) Módulo de distribución de solventes. b) Degasificador. c) Módulo controlador. d) Autosampler. e) Horno y columna y f) Detector UV/vis.

En los diferentes ensayos se usó: (i) como fase fija: columnas de fase reversa (C-18), de diversas marcas comerciales: *Pinnacle-II C18* (250 x 4,6 mm, 5 μ m; *Restek*), y *Synergi 4 μ POLAR-RP 80A* (150 x 4,6 mm, 4 μ m, *Phenomenex*). Esta última, posee un fenilo unido con función éter a la fase fija con protección hidrofílica diseñada para maximizar la retención y la selectividad de los analitos polares y aromáticos. Su principal ventaja reside en que es una columna mucho más estable para realizar corridas en las cuales la fase móvil tiene un alto porcentaje de H₂O. (ii) como fase móvil: los diferentes solventes de corrida, listados en la Tabla 6.1, cada uno adecuado para un sistema de análisis o mezcla de analitos.

Solvente de corrida	Composición	Flujo (ml/min)	pH
I	97 %KH ₂ PO ₄ (20 mM), 3% ACN	1,0	5,5
II	97 %KH ₂ PO ₄ (20 mM), 3% MeOH	1,0	5,5
III	NH ₄ Ac (10 mM)	0,6	6,8
IV	Acido fórmico 0,1 %	0,3	3,0

Tabla 6.1: Fase móvil o solventes de corrida empleados en las corridas cromatográficas. La composición está expresada como una relación de volúmenes. El pH que se indica en la última columna corresponde a la solución acuosa antes del agregado del solvente orgánico.

Para cuantificar las sustancias separadas por esta técnica, se realizaron curvas de calibración empleando soluciones patrón. Para ello, se prepararon por pesada, soluciones de la sustancia a ensayar en una concentración elevada, y luego, a partir de ella se procedió de dos maneras diferentes para obtener soluciones con concentraciones menores: (i) se realizaron diluciones con H₂O, y se inyectó en el equipo siempre el mismo volumen; (ii) se inyectaron diferentes volúmenes de la solución concentrada. En los dos casos, se obtuvo el correspondiente cromatograma a través del cual, se calculó por integración, el área debajo de los picos presentes y se construyeron curvas de área en función de la concentración, de las cuales luego de hacer un análisis lineal se obtuvo el factor de conversión necesario para calcular concentraciones a partir de las áreas obtenidas.

En la Figura 6.2 se muestra, a modo de ejemplo, la curva de calibración obtenida para Lum. Este tipo de curvas, realizadas para cada una de las sustancias que se cuantificaron (Lum y nucleótidos), se llevaron a cabo en las mismas condiciones de corrida

en que luego se realizaron los experimentos fotoquímicos. En todos los casos, se trabajó en condiciones experimentales tales que la relación entre el área y la concentración sea lineal.

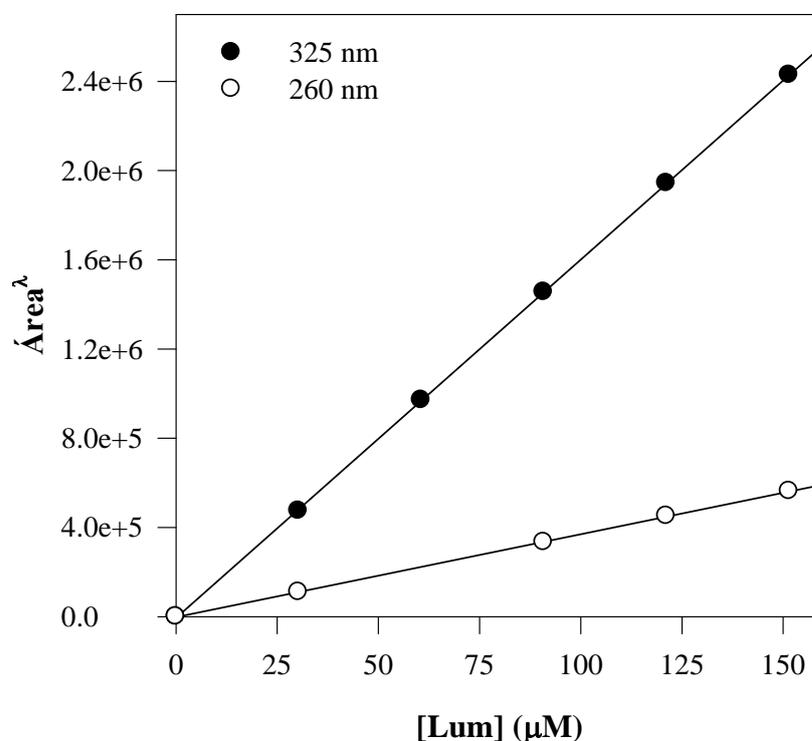


Figura 6.2: Curva de calibración para Lum. Solvente de corrida III, $\lambda_{\text{an}} = 260 \text{ nm}$ y 325 nm .

6.3 Espectrometría de masas por ionización *electrospray* (ESI-MS)

Esta técnica permite determinar con gran precisión la masa de distintos compuestos y así, ayudar a su identificación. El espectrómetro de masas genera la ionización mediante un campo eléctrico y/o magnético, y luego separa los núcleos atómicos en función de su relación masa/carga (m/z). El haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto⁴.

Los análisis se llevaron a cabo con un espectrómetro Q TRAP *Applied Biosystems* (AB Sciex Instruments 027130) acoplado a un equipo HPLC *Agilent* 1100 G1312A, el cual está equipado con una interfaz de ionización por *electro spray*, un analizador de cuadrupolos y un *software Analyst 1.4.2*. Como fase fija se usó una columna fase reversa *X-bridge* (150 mm, *Waters*) y como fase móvil se empleó ácido fórmico (0,1% p/v) a un flujo de 0,3 ml / min (solvente IV). El volumen de inyección fue 50 μl y la longitud de onda de análisis 260 nm. Los experimentos fueron realizados usando la interfaz ESI en modo negativo y positivo, con un potencial *decluster* (DP) de 30V. Vale la pena

aclarar que en modo ESI⁻, el equipo detecta iones moleculares que se generan por la pérdida de un H⁺ ([M-H]⁻), mientras que en modo ESI⁺ se detectan iones formados por la incorporación de un H⁺ ([M+H]⁺) o un catión ([M+Na]⁺, [M+K]⁺, etc) a la estructura molecular. Por otra parte, al aumentar el voltaje de la ionización se producen fragmentos que son detectados en el espectrómetro junto con el ión molecular. La temperatura en el capilar del *spray* fue 450°C y se usó N₂ como gas nebulizador. El rango de masa analizado por el espectrómetro de masas fue de 150 a 550 uma con una resolución de 0,1 uma. La ventaja de aplicar esta metodología, es que la muestra luego de separarse cromatográficamente, sufre una ionización por *electrospray*, lo que permite identificar qué iones corresponden a cada pico del cromatograma.

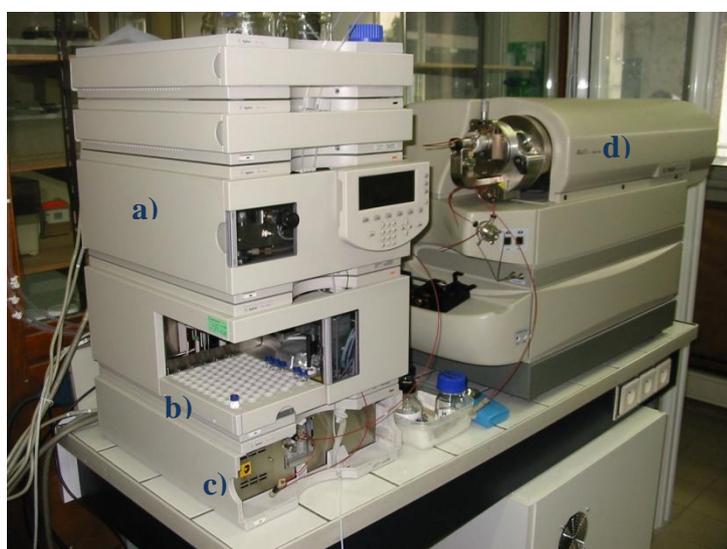
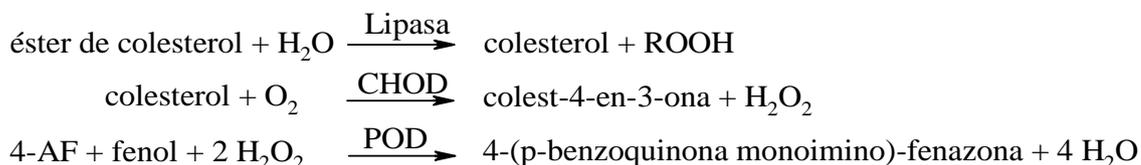


Figura 6.3: Fotografía del equipo HPLC acoplado al espectrómetro de masa utilizado. a) bomba, b) muestra, c) horno + columna, d) espectrómetro de masa.

6.4 Detección de H₂O₂

Para la determinación de agua oxigenada (H₂O₂) en solución acuosa se utilizó el *kit* comercial “COLESTAT enzimático” provisto por laboratorios Wiener. Este *kit* está diseñado para la determinación de colesterol en suero o plasma, pero puede ser utilizado para cuantificar H₂O₂, dado que mediante un conjunto de reacciones detalladas en el Esquema 6.1, el colesterol se libera de sus ésteres y luego se oxida para dar una cetona y H₂O₂. Finalmente el H₂O₂ se hace reaccionar con 4-aminofenazona (4-AF) y fenol para dar una quinona coloreada^{5,6} que puede cuantificarse espectrofotométricamente a 505 nm. Esta última reacción puede emplearse para medir H₂O₂ en solución. Por consiguiente, lo que se

hace habitualmente es modificar el método de determinación de colesterol para cuantificar H_2O_2 . Como se explicará a continuación, se agrega el reactivo comercial a la muestra que contiene H_2O_2 y la cantidad de quinona coloreada obtenida se la compara con la de una curva de calibración llevada a cabo con solución patrón de H_2O_2 .



Esquema 6.1: Secuencia de reacciones utilizadas en la medida de H_2O_2 . CHOD, lipasa y POD representan a las enzimas colesterol oxidasa, lipasa fungal y peroxidasa, respectivamente.

Cabe aclarar que las enzimas correspondientes a las dos primeras reacciones del Esquema 6.1 no interfieren porque son específicas para los sustratos indicados. De todas maneras, siempre se realizaron controles para descartar interferencias.

6.4.1 Reactivo de trabajo

El *reactivo de trabajo* se prepara colocando en una probeta 50 partes de agua destilada, 5 partes de reactivo 4-aminofenazona (4-AF) y 5 partes de reactivo fenol y se lleva a 100 partes con agua destilada. Luego se agregan 2 partes de las enzimas previamente homogeneizadas, y se mezcla por inversión, sin agitar. Pueden prepararse distintas cantidades respetando las proporciones establecidas. Es importante además, respetar el orden de agregado de los reactivos y asegurar una perfecta homogeneización de los mismos, a fin de evitar que el reactivo fenol deteriore las enzimas, provocando una alteración en la calidad del reactivo de trabajo. La composición final del reactivo en la preparación es: 6000 U/l de lipasa, 60 U/l de CHOD, 400 U/l de POD, 1,25 mM de 4-AF y 2,75 mM de fenol.

Una vez preparado el reactivo de trabajo se puede almacenar en frasco de vidrio color caramelo y conservar en refrigerador, presentando una estabilidad de aproximadamente un mes a partir del momento de su preparación. Los reactivos provistos son estables en refrigerador (2 - 10 °C) hasta la fecha de vencimiento indicada por el fabricante. Se debe evitar que los reactivos estén expuestos a temperaturas elevadas durante períodos de tiempo prolongados.

6.4.2 Metodología de trabajo

Se hizo una modificación del método original, con el objeto de aumentar la sensibilidad del mismo, y así poder detectar concentraciones de H_2O_2 del orden de μM . Por lo tanto, para la determinación de H_2O_2 se prepararon mezclas conteniendo 0,4 ml de muestra a ensayar y 1,8 ml de reactivo de trabajo (volumen final 2,2 ml), y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La absorbancia a 505 nm (A^{505}) se midió usando cualquiera de los espectrofotómetros citados en la Sección 6.1 en celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Los valores de A^{505} obtenidos para cada muestra fueron corregidos por el valor de absorbancia a la misma longitud de onda del blanco de reacción. El mismo consiste en una mezcla de la muestra sin irradiar con el reactivo colorimétrico.

6.4.3 Curva de calibración

Para construir la curva de calibración, se prepararon soluciones acuosas de H_2O_2 de distinta concentración. La determinación de dichas concentraciones se llevó a cabo de la siguiente manera: a partir del reactivo comercial *Merck* (110 vol.) se hicieron diluciones de tal manera de obtener soluciones con absorbancia a 254 nm entre 0,3 y 1, intervalo en el cual el error en las medidas de absorbancia es pequeño. Usando el valor de absorbancia a 254 nm y el coeficiente de absorción molar a esa longitud de onda ($\epsilon^{254} = 18,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se determinaron las concentraciones de H_2O_2 (aproximadamente 5,65-56,5 mM). A partir de estas soluciones de concentración conocida se realizaron diluciones para obtener concentraciones del orden de las que luego serían medidas en los experimentos. Estas diluciones se realizaron empleando material volumétrico de buena calidad y tomando precauciones necesarias para minimizar los errores.

Luego se tomaron muestras de 400 μl y se las hizo reaccionar con 1,80 ml del reactivo de trabajo, se las dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se midió la A^{505} (Figura 6.4a). Se graficó la absorbancia medida como una función de la concentración de H_2O_2 y se obtuvo una correlación lineal entre ambos parámetros en el intervalo de trabajo (valores de absorbancia hasta 0,7). De la curva de calibración (A^{505} vs $[\text{H}_2\text{O}_2]$) (Figura 6.4b) se obtuvo el valor de la pendiente (F), que se usó para transformar los valores de A^{505} de las muestras estudiadas en valores de concentración de H_2O_2 .

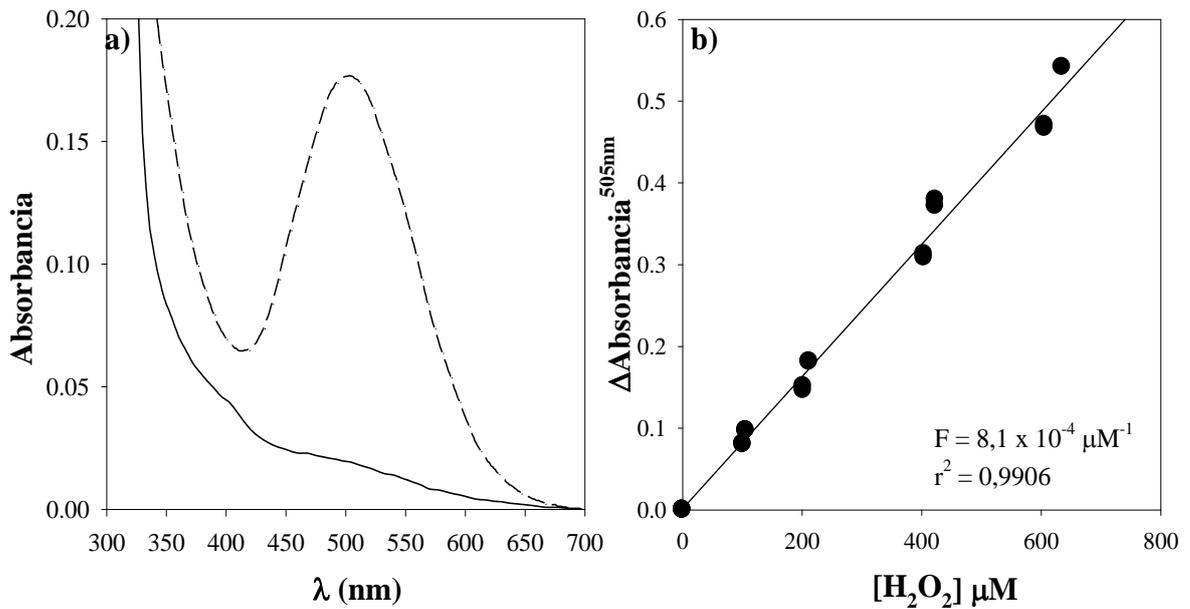


Figura 6.4: a) (---) Espectro de absorción del complejo coloreado correspondiente a una solución de $[H_2O_2] = 1,9 \cdot 10^{-4} M$. (—) Espectro de absorción correspondiente al blanco (reactivo de trabajo y H_2O). b) Curva de calibración (A^{505} vs $[H_2O_2]$).

6.5 Medida electroquímica de O_2 disuelto

La concentración del O_2 disuelto en las soluciones irradiadas se determinó electroquímicamente empleando un electrodo (*Orion*, modelo 37-08-99) sensible a dicho gas, conectado a un módulo integrador (*Consort C832 multichannel analyser*) el cual envía los datos a una PC (Figura 6.5a). Este tipo de determinaciones fueron realizadas en una celda de vidrio *pyrex* provista de cierre hidráulico dentro de la cual se coloca el mencionado electrodo y la solución a irradiar. Este dispositivo permite irradiar la solución y analizar, cuantitativamente, la variación de la concentración del O_2 disuelto en la solución simultáneamente. Si bien el electrodo cuenta con un “buzo” magnético colocado en su extremo, para reducir errores en la determinación, se coloca otro buzo en el fondo de la celda. Un agitador magnético se ubica por debajo de la celda, de modo tal que las soluciones sean agitadas durante todo el experimento. De esta manera, se logra una mejor homogeneización de la solución, evitando así variaciones en la concentración de O_2 localizadas.

Al inicio de la experiencia se llena completamente la celda con la solución a analizar y el electrodo se ajusta de manera tal que, no queden burbujas de aire en el interior de la celda, ni de permitir el intercambio de gases con el exterior, durante el experimento.

Cabe aclarar que la membrana del electrodo está protegida de la luz UV durante la irradiación por un dispositivo plástico.

Una vez preparado todo el dispositivo, se realiza la medida de la concentración de O_2 disuelto en la solución antes de ser irradiada. Todos los experimentos llevados a cabo con esta técnica se realizan usando soluciones inicialmente equilibradas en aire. Finalmente se inicia el experimento de irradiación estacionaria y sin apagar la lámpara se efectúan las medidas a distintos tiempos de irradiación.

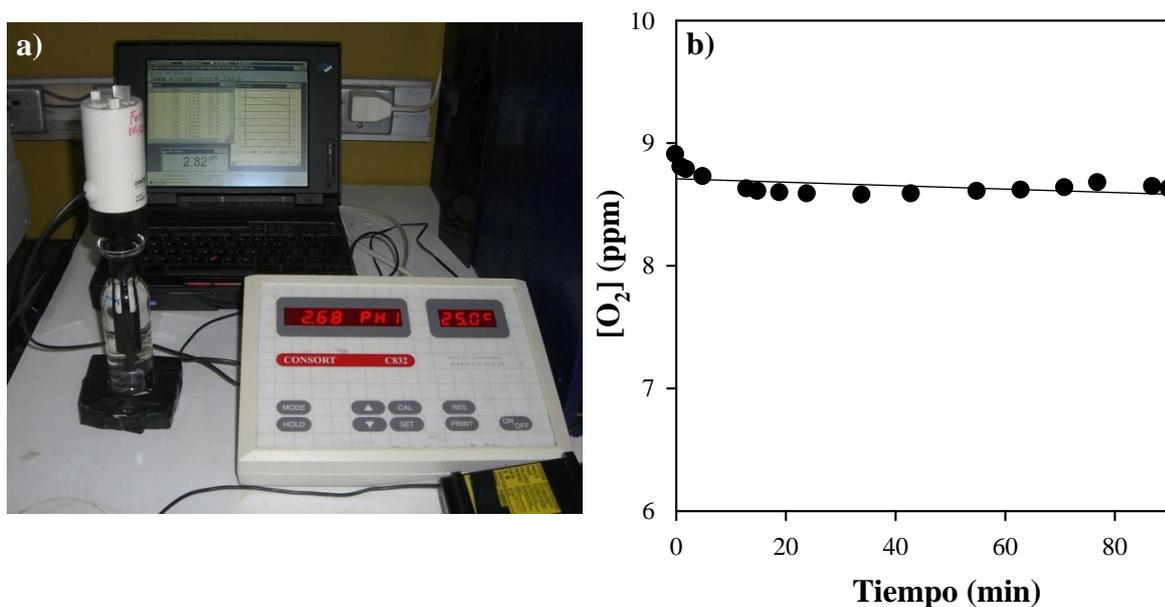


Figura 6.5: a) Fotografía del equipamiento utilizado para la medida electroquímica de O_2 . b) Medida de la concentración de O_2 en H_2O bajo irradiación. Este control se realizó respetando las condiciones y geometría empleadas en las fotólisis.

La Figura 6.5b muestra los resultados de un experimento control que monitorea la variación de la concentración de O_2 disuelto en agua durante un tiempo determinado de irradiación. Esta figura sirve no sólo para ilustrar lo descrito en los párrafos anteriores, sino para evaluar y descartar que la disminución en la concentración de O_2 observada en los experimentos sea resultado del descenso en la solubilidad del O_2 como consecuencia del leve calentamiento producido por la lámpara. Si bien el aumento de la temperatura de la solución es de sólo unos pocos grados centígrados, este efecto debe ser tenido en cuenta por la fuerte dependencia con la temperatura que muestra la solubilidad del O_2 en H_2O . El resultado de este control muestra que existe un ligero descenso en la concentración de O_2 en los primeros minutos de irradiación para luego alcanzar un valor que se mantiene prácticamente constante. Tal como se discutirá en los próximos capítulos, este descenso

puede despreciarse frente a los cambios en la concentración de O₂ observados en los experimentos de fotosensibilización de nucleótidos.

Este tipo de determinaciones son muy útiles a la hora de evaluar si dicho gas participa o no en las reacciones fotoquímicas estudiadas. Sin embargo, estos resultados no pueden ser comparados cuantitativamente con aquellos obtenidos en otros experimentos realizados empleando celdas de cuarzo, pues las condiciones experimentales difieren mucho a causa del dispositivo especial empleado para estas medidas.

6.6 Referencias

- 1 A. H. Thomas “Fotoquímica de ácido fólico, 6-formilpterina y 6-carboxipterina en solución acuosa”. Tesis Doctoral, UNLP, La Plata, Argentina (2001)
- 2 D. A. Skoog, J. J. Leary, *Análisis instrumental*, 4^{ta} Ed. McGraw Hill (1997)
- 3 G. W. Ewing, *Instrumentales de análisis químico*, McGraw Hill (1978)
- 4 R. Erra-Balsells, *Revista química viva*, **2004**, 3, 96-121
- 5 C. C. Allain, L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, P. C. Fu, *Clin. Chem.*, **1974**, 20, 470-475
- 6 H. M. Flegg, *Ann. Clin. Biochem.*, **1973**, 10, 79

Capítulo 7

Técnicas espectroscópicas avanzadas

7.1 Estudios por *single photon counting*

Se estudió la emisión de fluorescencia de lumazina (Lum) con un equipo *single photon counting*. Este equipo consta básicamente de dos lámparas, una pulsada y otra estacionaria, dos monocromadores, uno de emisión y otro de excitación; y un detector. La presencia de ambos monocromadores y de las dos lámparas permite estudiar la fluorescencia en estado estacionario y resuelto en el tiempo.

7.1.1 Fluorescencia en estado estacionario

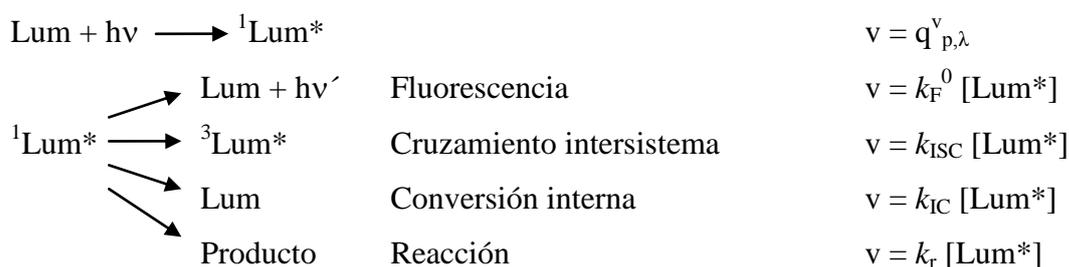
- **Espectros de emisión.** La emisión se observa cuando una molécula excitada pierde el exceso de energía radiativamente (Capítulo 1). Un espectro de emisión es un registro de la intensidad de la emisión como función de la longitud de onda y depende de la estructura química de la molécula y del solvente en que la misma está disuelta.¹ Los espectros de emisión, al igual que los espectros de absorción, dan información relacionada con los niveles de energía de los orbitales de las moléculas, y permiten, por ejemplo, estimar la diferencia de energía entre los estados electrónicos involucrados en una transición.

Como se explicó en el Capítulo 1, hay dos formas de emitir radiación: *fluorescencia* y *fosforescencia*. La primera corresponde a transiciones sin cambio de multiplicidad de espín, mientras que la segunda a transiciones entre estados de distinta multiplicidad.

Típicamente, la radiación de fluorescencia ocurre a longitudes de onda mayores que la correspondiente a la radiación incidente. Esta pérdida de energía, fenómeno conocido como corrimiento o desplazamiento de Stokes, se debe a una serie de fenómenos fisicoquímicos como: disipación de energía vibracional, redistribución de electrones en moléculas del solvente, tautomerización, reorientación de las moléculas de solvente e interacciones entre la molécula absorbente y las moléculas del solvente.¹

Todos los espectros de emisión que se mostrarán en la Parte III del presente trabajo de tesis corresponden a espectros de fluorescencia de Lumazina (Lum) bajo diferentes condiciones experimentales. Por otra parte, si bien es capaz de generar estados con multiplicidad de espín triplete, Lum presenta, en solución acuosa y a temperatura ambiente, una emisión de fosforescencia despreciable.² En estas condiciones las principales vías de desactivación de los estados tripletes consisten en desactivaciones no radiativas por interacciones con el solvente o con el O₂ disuelto.

El estado singlete excitado se produce por absorción de un fotón. El decaimiento del estado singlete de una molécula (por ejemplo, Lum), mediante la emisión de fluorescencia, compite con otras vías las cuales se muestran en el Esquema 7.1. En dicho esquema $q_{p,\lambda}^v$ es la intensidad de luz absorbida por el fluoróforo, k_F^0 es la constante de fluorescencia intrínseca, k_{ISC} es la constante de velocidad de cruzamiento intersistema, k_{IC} es la constante de velocidad de conversión interna y k_r es la constante de velocidad de reacción. Se denomina Σk_i a la suma de las constantes de las vías de decaimiento no radiativas distintas de la desactivación ($k_{ISC} + k_{IC} + k_r$).



Esquema 7.1: Vías de formación y decaimiento del estado singlete de Lum.

Para analizar la emisión se necesita un equipo con una fuente de excitación UV-visible. La longitud de onda de excitación (λ_{exc}) se selecciona haciendo pasar el haz de luz de excitación por un monocromador. La muestra, colocada en celdas de cuarzo, recibe la radiación de excitación en una cara de la misma. Posteriormente a la absorción, la muestra emite radiación en todas direcciones. La radiación emitida perpendicularmente a la dirección del haz de excitación, es dispersada en un segundo monocromador (de emisión). A la salida del mismo se ubica un detector que mide la cantidad de radiación emitida a una determinada longitud de onda (λ_{em}). Para obtener un espectro de emisión se excita la muestra siempre con la misma λ_{exc} y se mueve la red de difracción del monocromador de emisión para que el detector pueda registrar la radiación emitida en función de λ_{em} .

Para obtener los espectros de emisión se utilizó un equipo *Single Photon Counting FL900CDT (Edinburgh Analytical Instruments)* (Equipo I). Este equipo puede realizar medidas de estado estacionario (espectros de emisión, espectros de excitación), como así también, medidas resueltas en el tiempo (determinación de tiempos de vida de estados excitados). El equipo cuenta con dos lámparas diferentes: una pulsada y otra estacionaria. Para realizar los espectros de emisión se utilizó la lámpara estacionaria de alta presión de Xenón (419 kW).

Todas las medidas de fluorescencia se realizaron en soluciones acuosas. Se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. La temperatura de las muestras ($25,0 \pm 0,2$ °C) se reguló con la ayuda de un dispositivo de circulación de agua conectado a un termostato. Se registraron los espectros de emisión corregidos (el equipo corrige automáticamente la respuesta del fototubo y del monocromador de emisión) entre 360 y 650 nm, excitando con luz de longitud de onda correspondiente a la banda de menor energía de Lum (310-360 nm).

Además se realizaron algunas medidas de emisión empleando un espectrofluorómetro *Perkin-Elmer* LS50B (Equipo II). Con este equipo, se realizaron medidas de fluorescencia en estado estacionario. Estas medidas se emplearon en experimentos preliminares que permitieron luego diseñar los estudios sistemáticos con la técnica *Single Photon Counting*. En todos los experimentos realizados con el equipo *Perkin-Elmer* LS50B se utilizaron celdas para fluorescencia de 1 cm x 1 cm y de 1 cm x 0,4 cm. La luz de excitación utilizada fue de 340 nm.

Por último, también se realizaron algunas medidas de emisión empleando un espectrofluorómetro FluoroMax, *Horiba Jobin Yvon* (equipo III). Con este equipo, también se realizaron medidas de fluorescencia en estado estacionario. Especialmente este equipo fue utilizado para determinaciones de rendimiento cuántico, y todas las determinaciones del Capítulo 13. En todos los experimentos realizados con el equipo FluoroMax, *Horiba Jobin Yvon* se utilizaron celdas cuarzo de 1 cm x 1 cm.

• **Espectros de excitación.** Los espectros de excitación registran la intensidad de la emisión, a una frecuencia dada, como función de λ_{exc} . La excitación se realiza con luz de longitud de onda variable e intensidad fija. El espectro de excitación se puede representar como el rendimiento cuántico de emisión fluorescente (Φ_F) relativo a cada λ_{exc} . Generalmente, la mayoría de las moléculas fluorescentes tienen Φ_F y espectros de emisión independientes de λ_{exc} . En consecuencia, el espectro de excitación de una molécula fluorescente se superpone con su espectro de absorción.^{1,3}

Para la obtención de los espectros de excitación de Lum en solución se utilizó el equipo I, *Single Photon Counting*. La presencia de los dos monocromadores permite el registro de los dos diferentes tipos de espectros. Como se detalló en la sección anterior el espectro de emisión de una muestra se registra manteniendo el monocromador de excitación en una λ fija (λ_{exc}). Por el contrario, para obtener el espectro de excitación debe

mantenerse el monocromador de emisión a una λ fija a la cual emite la muestra (λ_{em}), que generalmente coincide, con el máximo de emisión. El movimiento del monocromador de excitación permite seleccionar la λ de la radiación absorbida por la muestra. Así puede medirse la intensidad de emisión a una λ_{em} dada como función de la λ_{exc} .

La intensidad de la luz incidente varía con la λ debido a que la lámpara no provee una misma intensidad de luz en todo su espectro de emisión. Entonces los espectros de excitación resultan distorsionados, y por lo tanto, debe realizarse una corrección de la señal de intensidad de la emisión de la muestra, transformándola en una señal proporcional al número de fotones incidentes. Para ello se usan referencias, a modo de contadores de fotones, como rodamina B, fluoresceína o bisulfato de quinina, según el intervalo de λ necesario. El máximo de emisión y el rendimiento cuántico de emisión de estas referencias es independiente de la λ de la luz incidente, en determinadas zonas del espectro, por lo que proveen una emisión, a λ constante, proporcional al flujo de fotones de la luz incidente.

Los espectros de excitación del compuesto estudiado se tomaron empleando como referencia rodamina B en etilenglicol (3 g/l). Este compuesto es adecuado para ser utilizado como referencia en el intervalo comprendido entre 220 y 600 nm.¹ Los espectros se obtuvieron excitando con luz entre 225 y 450 nm, y se registró la emisión a 460 nm, λ cercana al máximo de emisión de Lum en solución acuosa.

7.1.2 Estudio resuelto en el tiempo de la fluorescencia

En las técnicas resueltas en el tiempo se genera una cierta población de moléculas en estados electrónicamente excitados mediante un pulso de radiación electromagnética. Luego de dicho pulso se estudia alguna propiedad del sistema como una función del tiempo. Tal propiedad puede ser la emisión de un compuesto. De esta manera se pueden estudiar la fluorescencia y la fosforescencia con este tipo de técnicas. Por lo expuesto anteriormente, el decaimiento de la fluorescencia es generalmente mucho más rápido que el correspondiente al proceso de emisión fosforescente.

El tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) de una sustancia representa el tiempo promedio en que una población de moléculas excitadas disminuye a 1/e de su valor inicial.¹ Ya que en este caso la transición ocurre desde un estado excitado singlete, τ_F es el tiempo de vida de dicho estado singlete. Además, como se explicará más adelante, la determinación del τ_F proporciona valiosa información en procesos de desactivación.

Para realizar las medidas de este parámetro se necesitan equipos electrónicos y detectores de muy alta velocidad dado que sus valores son, generalmente, del orden del nanosegundo. La técnica consiste en excitar la muestra con un pulso de luz muy corto de λ apropiada y registrar el decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo. El pulso de luz genera un cierto número de moléculas en estado singlete excitado (N^*). La velocidad con que decrece N^* puede describirse con la siguiente ecuación:

$$\frac{d(N^*)}{dt} = -k_F N^* \quad (1)$$

donde k_F es el coeficiente de velocidad de emisión espontánea, y es la sumatoria de todas las vías de decaimiento del singlete descritas en el Esquema 7.1. Al integrar esta ecuación se obtiene:

$$N^*_t = N^{*0} e^{(-k_F t)} \quad (2)$$

donde N^*_t y N^{*0} son el número de moléculas en estado excitado a un tiempo t y 0 , respectivamente. Por ello se espera que la intensidad de fluorescencia, que es proporcional al número de moléculas en el estado excitado, tenga un decaimiento exponencial.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el τ_F se define como el tiempo requerido para que la intensidad de fluorescencia alcance $1/e$ de su valor inicial. Es decir:

$$\tau_F = \frac{1}{k_F} \quad (3)$$

donde k_F corresponde a la suma de todas las constantes de velocidad de los distintos procesos que contribuyen al decaimiento del estado excitado.

Para las medidas de τ_F se utilizó el equipo I. Para los estudios resueltos en el tiempo este equipo utiliza una lámpara pulsada de nitrógeno (pureza $> 99,9995$), a 1,3 bar, y alimentada con una tensión de 6,3 kV y una frecuencia de repetición de 40 kHz. En estas condiciones emite, por cada pulso, una intensidad del orden de 10^{10} fotones. El alcance del equipo es 500 ps – 500 μ s, pero para las medidas del presente trabajo se utilizó una resolución de 500 ps – 100 ns.

Los decaimientos se midieron a 450 nm, ya que esta longitud de onda es muy cercana al máximo de emisión de Lum en solución acuosa (Capítulos 4 y 9) y la luz de excitación se eligió de tal manera de irradiar a Lum en su banda de menor energía (310-350 nm). Es decir, en estos experimentos se trabaja a λ_{exc} y λ de análisis constante. Los τ_F

se obtuvieron del decaimiento monoexponencial observado luego de la deconvolución de la señal de la lámpara, mediante el uso de software provisto por *Edinburgh Analytical Instruments*.

7.1.3. Determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia

En fotoquímica existen dos leyes fundamentales. La primera ley fue formulada por Grotthuss y Draper y establece que *sólo la luz absorbida por una molécula puede producir cambio fotoquímico en la misma*. Se enfatiza luz absorbida, es decir, que la luz que simplemente pasa por el sistema no produce cambio alguno. La evolución de la teoría cuántica llevó a Stark y Einstein a complementar esta ley, originando la segunda ley de la fotoquímica: *si una especie absorbe radiación, por cada cuanto de energía absorbido se excita solamente una molécula*. Esto indica que un solo fotón es responsable del cambio fotoquímico en una molécula. Sobre la base de estas dos leyes fundamentales puede definirse el término rendimiento cuántico.

El rendimiento cuántico de un proceso fotofísico, como la fluorescencia (Φ_F), puede expresarse en términos del número de moléculas fluorescentes respecto de cada fotón absorbido:

$$\Phi_F = \frac{\text{Nro moléculas fluorescentes por unidad de tiempo y por unidad de volumen}}{\text{Nro de cuantos absorbidos por unidad de tiempo y por unidad de volumen}} \quad (4)$$

Como el número de fotones absorbidos es proporcional a la intensidad de la radiación absorbida (I_A) y el número de fotones emitidos por fluorescencia es proporcional a la intensidad de radiación fluorescente (I_F):

$$\Phi_{(\lambda)F} = \frac{I_F}{I_A} \quad (5)$$

El $\Phi_{(\lambda)F}$ de especies moleculares (d) puede ser determinado experimentalmente por comparación de la intensidad de fluorescencia, I_F , medida como el área debajo del espectro de fluorescencia corregido (I_d) y la intensidad de fluorescencia, medida de la misma forma, de una solución de una referencia de rendimiento cuántico conocido (I_R). Como la cantidad de fotones absorbidos por la muestra y la referencia puede ser distinta, debe realizarse una corrección teniendo en cuenta las absorbancias de ambas sustancias a la longitud de onda de excitación (A_d y A_R , respectivamente). Utilizando el mismo equipo, en idénticas

condiciones (longitud de onda de excitación, celda, abertura de las rendijas, temperatura, etc.) el $\Phi_{(\lambda)F}$ se determina con la ecuación:

$$\Phi_{(\lambda)d} = [(A_R \cdot I_d \cdot n_d^2) / (A_d \cdot I_R \cdot n_R^2)] \Phi_R \quad (6)$$

donde n es el índice de refracción del solvente. Esta ecuación es válida sólo para soluciones diluidas, con absorbancia no mayor a 0,10. Además, la diferencia entre los valores de A_d y A_R no debe ser superior a 0,001.

Para la determinación de los $\Phi_{(\lambda)F}$ se utilizaron los equipos I y III descritos anteriormente. Los $\Phi_{(\lambda)F}$ fueron determinados a partir de los espectros de fluorescencia corregidos obtenidos por excitación a 325 y 350 nm, usando como referencias (i) *bisulfato de quinina (Riedel-deHaen)* en solución acuosa de H_2SO_4 0,5 M ($\Phi_F = 0,546$).^{4,5} y (ii) 9,10 di-fenil antraceno (9,10-DPA) disuelto en ciclohexano ($\Phi_F = 0,95$)⁶. Los espectros de emisión de las referencias se muestran en la Figura 7.1. Para evitar efectos de filtro interno, la absorbancia de la solución a la λ_{exc} se fijó en un valor inferior a 0,10.

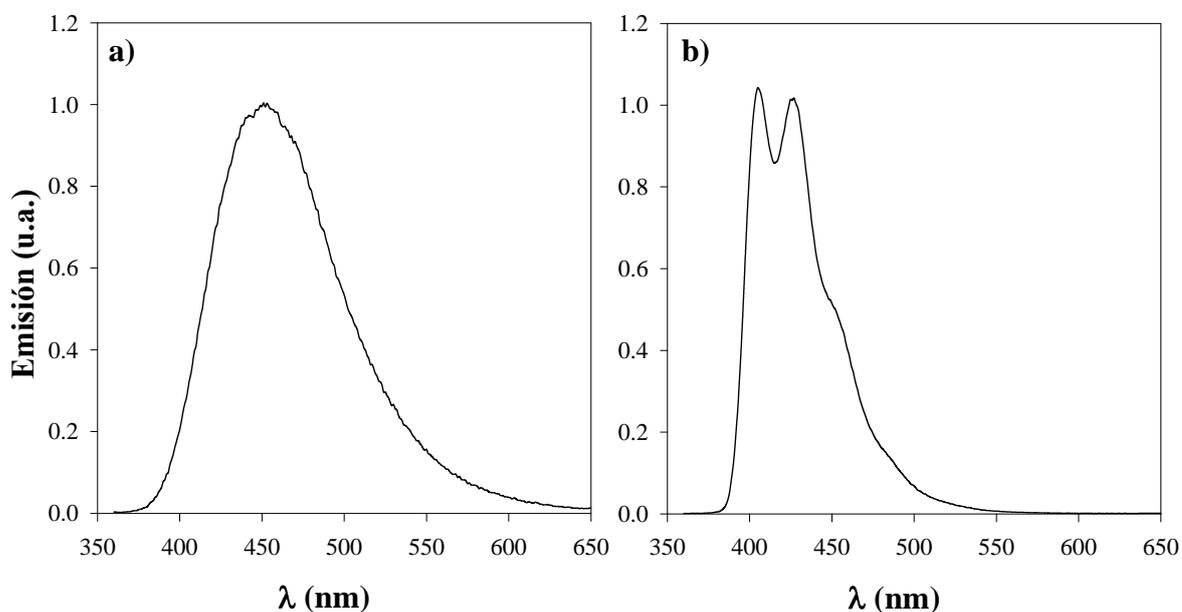


Figura 7.1: Espectros de emisión normalizados de: a) sulfato de quinina en solución acuosa de H_2SO_4 0,5 M. b) 9,10 di-fenil antraceno (9,10-DPA) disuelto en ciclohexano.

7.1.4 Desactivación de fluorescencia

La desactivación de una molécula en estado excitado por influencia del entorno (por ejemplo, un desactivador), específicamente la desactivación de fluorescencia, se

refiere a procesos que provocan una disminución de la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada. Este fenómeno puede ser el resultado de varios mecanismos. Estos mecanismos incluyen reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y desactivación por colisiones.¹ La desactivación de fluorescencia provee evidencia de interacciones moleculares.

En la ecuación 7 se representa la desactivación de Lum excitada por una molécula desactivadora Q junto con la ecuación de velocidad de dicho proceso:



donde k_q es la constante de velocidad bimolecular de desactivación.

Los procesos de desactivación pueden clasificarse en dos grandes grupos: (i) “*desactivación dinámica o por colisiones*”, cuando el entorno (desactivador) interfiere en el comportamiento del estado excitado luego de su formación, ya sea por transferencia de energía o de electrones y (ii) “*desactivación estática*”, cuando el entorno impide la formación del estado excitado.⁷

Ambos tipos de desactivación requieren del contacto molecular entre la molécula fluorescente y la molécula desactivadora. Este fenómeno es especialmente importante en soluciones acuosas donde las colisiones son frecuentes. En solución, el proceso difusional limita la velocidad con que se encuentran ambas moléculas (fluoróforo y desactivador), pero hace prolongado el encuentro pudiendo ocurrir cientos de choques antes de separarse.

Una gran variedad de sustancias pueden actuar como desactivadores de la fluorescencia de un determinado compuesto. El ejemplo más representativo de desactivación por colisión está dado por el O₂ molecular. Esta es una de las razones por las cuales, muy frecuentemente, es necesario eliminar el O₂ disuelto de las muestras sobre las que se desea medir τ_F , $\Phi_{(\lambda)F}$, etc. Otros ejemplos son las aminas alifáticas y aromáticas, xenón, peróxido de hidrógeno, acrilamida, anión bromato, anión yoduro, etc. Debido a la gran variedad de moléculas desactivadoras, se debe identificar aquéllas de interés para cada fluoróforo en particular.

- ***Desactivación dinámica o por colisiones.*** Los procesos de desactivación dinámica, están relacionados con las colisiones (encuentros difusivos) entre el fluoróforo y el desactivador durante el tiempo de vida del estado excitado del fluoróforo. Dado un proceso de desactivación dinámica, puede calcularse la constante de velocidad del proceso de

desactivación analizando espectros de emisión del compuesto estudiado en presencia y ausencia de desactivador. Para ello se utiliza la ecuación de Stern-Volmer:

$$I_F^0/I_F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_F^0 [Q] \quad (8)$$

donde I_F^0 e I_F son las intensidades de emisión fluorescente en ausencia y presencia del desactivador, respectivamente, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, $[Q]$ es la concentración del desactivador, k_q es la constante bimolecular de desactivación y τ_F^0 es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora en ausencia de desactivador.

Esta ecuación puede deducirse planteando el estado estacionario de la fluorescencia de una molécula excitada en presencia de un desactivador.¹ La molécula desactivadora puede ser cualquiera, pero debe permanecer químicamente invariable para que la disminución de la concentración del estado excitado, y por consiguiente, de la emisión fluorescente, se deba a una única interacción entre la molécula emisora y ella.

El rendimiento cuántico de fluorescencia ($\Phi_{(\lambda)F}^0$) en ausencia de desactivador está dado por:

$$\Phi_{(\lambda)F}^0 = \frac{k_F^0}{k_F^0 + \sum k_i} = \frac{k_F^0}{k_F} \quad (9)$$

Mientras que en presencia de desactivador es igual a:

$$\Phi_{(\lambda)F} = \frac{k_F^0}{k_F^0 + \sum k_i + k_q [Q]} = \frac{k_F^0}{k_F + k_q [Q]} \quad (10)$$

donde k_F , definida como el coeficiente de velocidad de emisión espontánea, es igual a la suma de las constantes de velocidad que contribuyen al decaimiento de Lum* ($k_F = k_F^0 + \sum k_i$), excepto k_q . Debe observarse que $\Phi_{(\lambda)F}$ disminuye en una cantidad proporcional a la concentración del desactivador. Se obtiene el valor máximo de $\Phi_{(\lambda)F}^0$ en ausencia de desactivador. La relación $\Phi_{(\lambda)F}^0/\Phi_{(\lambda)F}$ está dada por:

$$\frac{\Phi_{(\lambda)F}^0}{\Phi_{(\lambda)F}} = \frac{k_F^0}{k_F} \frac{k_F + k_q [Q]}{k_F^0} = 1 + \frac{k_q [Q]}{k_F} \quad (11)$$

Esta ecuación indica que la relación de los $\Phi_{(\lambda)F}$ es linealmente dependiente de la concentración del desactivador, siendo la ordenada al origen igual a 1. Esta relación se denomina *relación de Stern-Volmer*.

La determinación de $\Phi_{(\lambda)F}$ requiere del conocimiento de la intensidad de luz absorbida. Sin embargo, si se realizan medidas de intensidad de fluorescencia en función de la concentración del desactivador, bajo idénticas condiciones de geometría de irradiación, concentración de molécula fluorescente, intensidad de excitación, λ y sensibilidad de detector, entonces la luz absorbida es idéntica para cada medida. Bajo dichas circunstancias, la relación $\Phi_{(\lambda)F}^0/\Phi_{(\lambda)F}$ es igual a la relación de intensidades de emisión fluorescente. Reemplazando en la ecuación (11), se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + \frac{k_q [Q]}{k_F} \quad (12)$$

Así una gráfica de I_F^0/I_F en función de $[Q]$ debería ser lineal, e interceptar en la unidad al eje I_F^0/I_F (Figura 7.2). La pendiente de dicha gráfica se denomina constante de Stern-Volmer (K_{SV}) y es igual a $k_q/k_F = \tau_F^0 k_q$. En esta última expresión τ_F^0 es el parámetro τ_F definido en la Sección 7.1.2. Sin embargo, en los experimentos de desactivación se le suele agregar el superíndice “0” para diferenciarlo de los τ_F en presencia del desactivador.

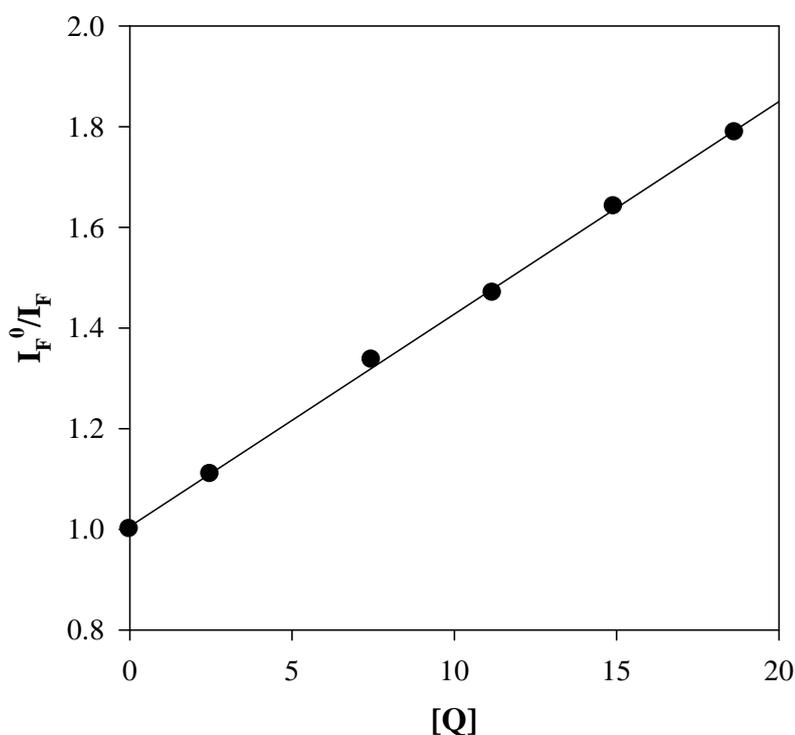


Figura 7.2: Gráfico de Stern-Volmer.

El análisis de las gráficas de Stern-Volmer permite obtener información muy importante. Por ejemplo, la determinación de K_{SV} es un método indirecto para obtener el valor de τ_F^0 si se conoce k_q , o por el contrario, puede determinarse k_q si se conocen los τ_F^0 . Por otro lado, una gráfica de Stern-Volmer lineal generalmente indica la presencia de un solo fluoróforo o especie emisora. Por el contrario, si la gráfica de Stern-Volmer no es lineal puede suponerse la presencia de dos poblaciones distintas de fluoróforos (entre otros mecanismos).

Es importante remarcar que una gráfica de Stern-Volmer lineal no asegura que el proceso de desactivación estudiado sea de tipo dinámico. Como se explicará a continuación, un proceso de desactivación de tipo estático también genera un comportamiento lineal en las gráficas de Stern-Volmer. Debido a ello, debe recurrirse a otras medidas, que serán expuestas más adelante, para distinguir entre ambos tipos de procesos.

Puede deducirse rápidamente que, si la desactivación es de tipo dinámico el cociente de los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia y presencia de desactivador (τ_F^0/τ_F) es igual al cociente de los correspondientes rendimientos cuánticos de fluorescencia ($\Phi_{(\lambda)F}^0/\Phi_{(\lambda)F}$ o I_F^0/I_F).

$$\Phi_{(\lambda)F}^0 = k_F^0 \tau_F^0 \quad (13)$$

$$\Phi_{(\lambda)F} = k_F \tau_F \quad (14)$$

$$\Phi_{(\lambda)F}^0 / \Phi_{(\lambda)F} = (k_F^0 \tau_F^0) / (k_F \tau_F) = \tau_F^0 / \tau_F \quad (15)$$

Por consiguiente, puede escribirse la siguiente ecuación para describir la dependencia de los τ_F y/o I_F con la concentración de desactivador:

$$\frac{\tau_F^0}{\tau_F} = \frac{I_F^0}{I_F} = 1 + k_q \tau_F^0 [Q] \quad (16)$$

• **Desactivación estática.** Los procesos de desactivación también pueden ocurrir como producto de la formación de complejos no fluorescentes de los estados electrónicos fundamentales del fluoróforo y el desactivador.

La dependencia de la intensidad de fluorescencia (I_F) con la concentración de desactivador puede deducirse considerando la constante de asociación (K_S)¹:

$$K_S = \frac{[MQ]}{[M] \cdot [Q]} \quad (17)$$

donde [MQ] es la concentración del complejo y [M] es la concentración del fluoróforo libre, que no forma parte del complejo. Si el complejo MQ no emite, la relación de intensidades I_F^0/I_F será igual a la relación de concentraciones $[M]_0 / [M]$, donde $[M]_0$ es la concentración total del fluoróforo.

$$[M]_0 = [M] + [MQ] \quad (18)$$

Combinando ambas ecuaciones se obtiene:

$$K_S = \frac{[M]_0 - [M]}{[M] \cdot [Q]} = \frac{[M]_0}{[M] \cdot [Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (19)$$

$$\Rightarrow \frac{[M]_0}{[M]} = \frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_S [Q] \quad (20)$$

Puede apreciarse que, tal como se dijo, un proceso de desactivación estática también conduce a una relación de Stern-Volmer lineal.

Si existe una desactivación estática una fracción del compuesto emisor se encuentra “secuestrada” formando parte del complejo no emisor. Por lo tanto, la fluorescencia observada proviene del fluoróforo “libre”. Esta fracción no ha sido alterada, por lo que, el τ_F que se mide es igual al tiempo de vida en ausencia del desactivador (τ_F^0). En definitiva, el cociente τ_F^0/τ_F será independiente de la concentración del desactivador, es igual a 1 como lo indica la siguiente ecuación:

$$\frac{\tau_F^0}{\tau_F} = 1 \quad (21)$$

7.2 Estudios de absorción triplete-triplete por fotólisis de destello láser

La técnica de fotólisis de destello láser utiliza un pulso de luz UV, visible o IR para generar especies transientes, en cantidad suficiente como para observarlas espectroscópicamente. Esta técnica permite obtener espectros de las especies excitadas y seguir su evolución en el tiempo.

7.2.1 Conceptos teóricos

En las distintas etapas que tienen lugar en los experimentos de fotólisis de destello láser se observan diferentes transiciones entre los estados excitados (Figura 7.3). Estas

transiciones son las responsables de la variación de la intensidad de la absorbancia.

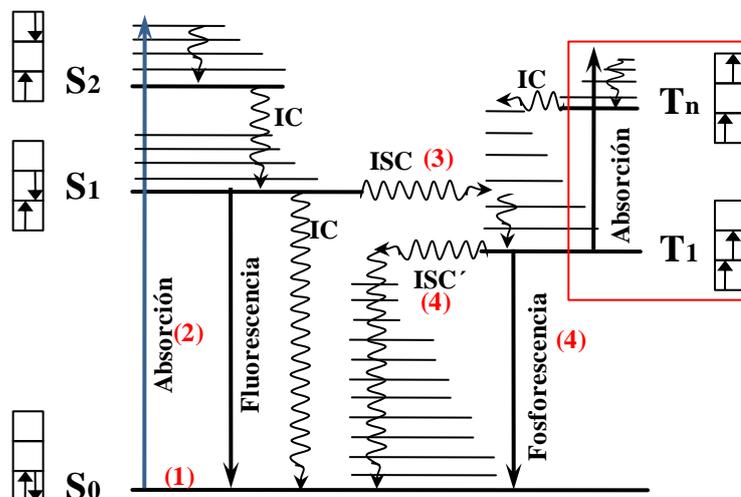


Figura 7.3: Diagrama de Jablonski modificado. El recuadro rojo resalta la transición triplete-triplete que tiene lugar durante los experimentos de fotólisis de destello láser.

Brevemente, en la etapa (1) la muestra tiene la configuración electrónica propia del estado fundamental (S₀). Al excitar la muestra con el pulso de láser (2) se genera una alta población de especies en el estado excitado singlete (S₁) y, consecuentemente, tiene lugar el proceso de entrecruzamiento de sistemas o ISC (3). Esta última transición produce la formación de estados excitados de tipo triplete (T₁). A su vez, las moléculas en estado T₁ presentan un espectro de absorción (transición T₁→T_n) diferente al observado para las moléculas en su estado fundamental (es decir, para la transición S₀→S₁). Finalmente, T_n puede desactivarse decayendo al estado S₀ (4) por ISC' y/o por fosforescencia generando una disminución en la absorbancia del estado triplete.

En cualquier instante de tiempo, la variación de la absorbancia con el tiempo se describe matemáticamente con la siguiente ecuación:

$$\Delta A(t) = \log \left(\frac{P^0}{P(t)} \right) \quad (22)$$

donde P⁰ es la energía medida por el fotomultiplicador antes del pulso del láser y P(t) representa la energía medida por el fotomultiplicador a un cierto tiempo t luego del pulso del láser. Una señal típica se representa en la Figura 7.4.

En un sistema simple, en donde solo se genera el estado triplete, la relación entre

ΔA y la concentración está dada por la Ecuación 23:

$$\Delta A(t) = \log \left(\frac{P^0}{P(t)} \right) = \Delta \varepsilon \cdot C_T(t) \cdot l \quad (23)$$

donde $\Delta \varepsilon$ es la diferencia entre los coeficientes de absorción de los estados triplete y fundamental, $C_T(t)$ es la concentración del transiente al tiempo t y l es el camino óptico.

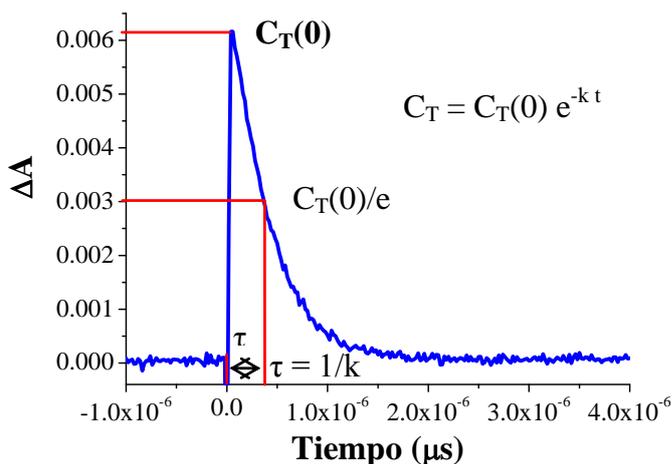


Figura 7.4. ΔA observada en un experimento típico de fotólisis de destello conjuntamente con los parámetros más relevantes de la señal.

7.2.2 Descripción del equipo

Para estas determinaciones se utilizó el sistema de láser de nanosegundo (ns) esquematizado en las Figuras 7.5, 7.8 y 7.9. Como se discutirá más adelante, este sistema ns se utilizó para: (i) estudios cinéticos de los estados tripletes del sensibilizador y (ii) determinación de rendimientos cuánticos de producción de 1O_2 .

El sistema ns utilizado consta de un láser Nd:YAG (Quanta-Ray GCR 230), que opera a 10 Hz, cuyo haz de salida fundamental de 1064 nm se triplica para generar un haz de salida correspondiente al tercer armónico del mismo (355 nm). La duración del pulso generado es de ~ 5 ns de largo. Para separar el haz fundamental, el segundo y el tercer armónico entre sí, se utiliza un prisma Pellin-Broca (Figura 7.5). El tercer armónico puede usarse directamente o también puede ser enfocado en una celda Raman que contiene gas H_2 . Al usar el haz de 355 nm para excitar la celda Raman se obtienen, con apreciable intensidad, la primera, segunda y tercera línea Stokes a ~ 416 nm, 498 nm y 609 nm, respectivamente. A su vez, también se obtiene la primera línea anti-Stokes a 309 nm. Las diferentes líneas se dispersan entre sí usando otro prisma Pellin-Broca, permitiendo así

seleccionar la longitud de onda de salida deseada. La energía del láser requerida para cada experimento se obtiene reduciendo la intensidad total del haz de salida mediante el empleo de filtros de densidad neutral o cambiando la energía de la lámpara de destello usada para bombear el láser. Finalmente, la intensidad de energía es determinada utilizando un medidor de energía digital FieldMax-TO (Coherent).^{8,9}

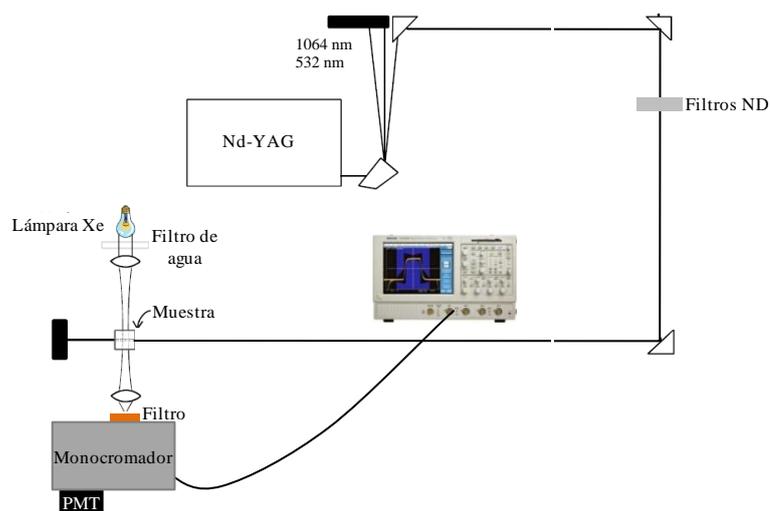


Figura 7.5: Esquema del sistema utilizado para las medidas de fotólisis de destello láser.

Para detectar a las especies transientes, se colocó en ángulo recto al haz del láser ($\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$) una lámpara de estado estacionario Xe 200 W. La luz proveniente de la lámpara de Xe se hizo atravesar, primero, por un filtro de agua para remover los componentes infrarrojos (Figura 7.5). A continuación, la luz transmitida a través de la muestra fue enfocada y dispersada por una red de difracción en un fotomultiplicador o PMT (*Hamamatsu R928*). Para evitar que cualquier reflexión o dispersión de la luz del láser ingrese al detector, se colocó un filtro adecuado en la entrada de la red. La señal resultante en el tiempo fue registrada y monitoreada con un osciloscopio (*Tektronix TDS5032B*), activado/disparado por la señal desde la salida *Q-switch* del láser. La cantidad de luz transmitida a través de la muestra fue monitoreada tanto en presencia como en ausencia del pulso del láser. De esta manera, se pudo detectar una diferencia de absorbancia dependiente del tiempo ($\Delta A(t)$), que dependerá de la presencia del estado triplete del sensibilizador. Debido a que el PMT está combinado a un monocromador (*Chromex*), es posible observar, selectivamente, la cantidad de luz absorbida a cualquier longitud de onda dada.

Asimismo, la amplitud de la señal del transiente registrada se puede corregir teniendo en cuenta la dependencia con la longitud de onda tanto de la eficiencia de difracción de la red, como de la respuesta del PMT (Figura 7.6), para obtener el correspondiente espectro de absorción del transiente.

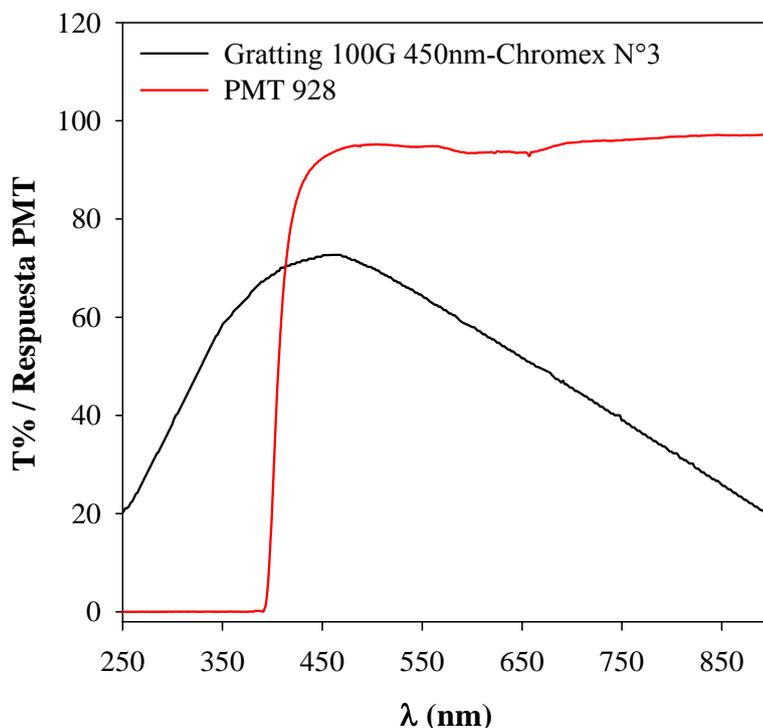


Figura 7.6: (—) Dependencia de la eficiencia de difracción de la red y (—) de la respuesta del PMT con la longitud de onda.

7.2.3 Preparación de las muestras

Se prepararon soluciones acuosas de Lum de absorbancia aproximadamente 0,85 a la longitud de onda de irradiación (355 nm). Se trabajó solo en condiciones de pH alcalino (~ 10,5) por razones que se discutirán más adelante. El pH se ajustó utilizando soluciones de HCl y NaOH. Una vez que las soluciones se colocaron en la celda, se burbujearon con N₂ durante 20 minutos. En algunos casos, las soluciones también se burbujearon con aire y con O₂. Se realizaron controles espectrofotométricos de las soluciones antes y después de los disparos del láser.

Con el objeto de determinar la existencia de procesos de desactivación del estado excitado triplete de Lum, se prepararon mezclas conteniendo Lum y nucleótido, Lum y KI, y Lum de diferentes concentraciones, las cuales también se burbujearon con N₂.

7.2.4 Decaimiento del triplete y espectros de transientes

Se registraron los decaimientos de la señal luego del disparo del láser a distintas longitudes de onda, en el intervalo de 400 a 600 nm (en general, a intervalos constantes de 5 o 10 nm). Se registró en forma rutinaria un promedio de 450 señales para aumentar la relación señal-ruido. Para evitar fotodegradación de la muestra, la solución se agitó entre las medidas realizadas a cada longitud de onda o se reemplazó por una alícuota de la misma solución madre. Se utilizaron celdas de cuarzo de camino óptico 1 cm colocadas en un porta celda. En la mayoría de los experimentos se utilizaron escalas de tiempo de 4 $\mu\text{s}/\text{div}$. Pero en algunos casos se modificó, con el objeto de estudiar ventanas de tiempo más largas.

Experimentos similares a los aquí detallados, no se pudieron realizar en medio ácido debido a que la forma ácida de Lum presenta una absorción muy débil a 355 nm (Capítulo 3). Por lo tanto, se decidió excitar las muestras con $\lambda = 309$ nm. Para ello se seleccionó la primera línea anti-Stokes obtenida luego de excitar una celda Raman de H_2 con el tercer armónico generado por el láser de Nd-YAG (tal como se describió en la Sección 7.2.2), sin embargo, la energía del láser en esta longitud de onda resultó ser mucho menor que a 355 nm, y en consecuencia, no se logró detectar al transiente irradiando a esta λ . Por lo tanto, en medio ácido, se decidió estudiar el $^3\text{Lum}^*$ por mecanismos indirectos a través de la formación de $^1\text{O}_2$, el cual es detectado por su emisión en el infrarrojo cercano (NIR). Estos experimentos se detallarán más adelante en este capítulo.

7.3 Estudios de oxígeno singlete

7.3.1 Introducción

En el Capítulo 1 se expusieron las características generales del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), junto con las diferentes vías a través de las cuales se genera esta especie. En particular, se describió el mecanismo de generación fotosensibilizada de $^1\text{O}_2$, el cual consiste en la transferencia de energía desde una molécula electrónicamente excitada al O_2 disuelto en el medio. Consecuentemente, el sensibilizador vuelve al estado basal, y el O_2 queda en su estado excitado singlete ($^1\text{O}_2$) (Figura 7.7).

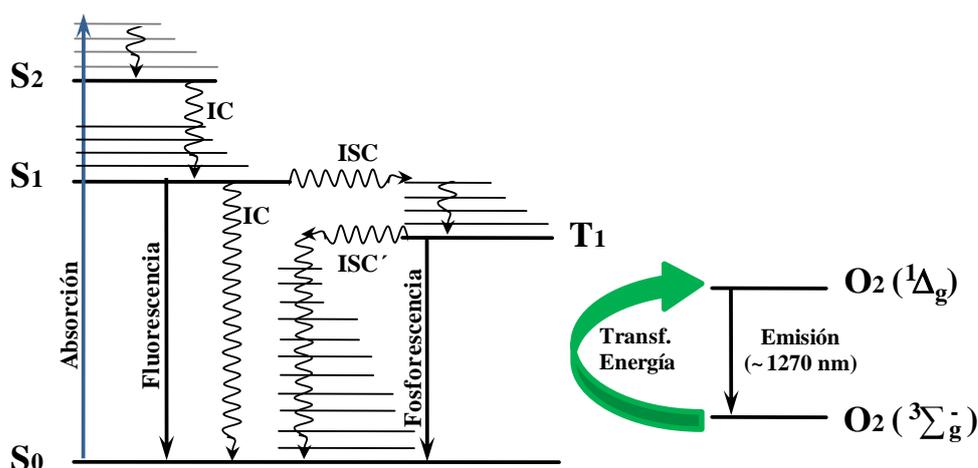


Figura 7.7: Diagrama de Jablonski modificado que representa la producción fotosensibilizada de oxígeno singlete.

La desactivación del $^1\text{O}_2$ puede ocurrir en forma no radiativa (transferencia de energía al solvente) o radiativa (emitiendo luz). En presencia de otra sustancia capaz de actuar como desactivador (Q), deben considerarse las desactivaciones del $^1\text{O}_2$ por reacción química y por desactivación física. En la Tabla 7.1 se detallan las reacciones correspondientes a cada una de estas vías de desactivación junto con las correspondientes expresiones matemáticas de sus velocidades de reacción.

Vías de desactivación de $^1\text{O}_2$		velocidad
$^1\text{O}_2$	\longrightarrow $^3\text{O}_2$	$k_d [^1\text{O}_2]$
$^1\text{O}_2$	\longrightarrow $^3\text{O}_2 + h\nu'$	$k_e [^1\text{O}_2]$
$Q + ^1\text{O}_2$	\longrightarrow QO_2	$k_r^Q [^1\text{O}_2] [Q]$
$Q + ^1\text{O}_2$	\longrightarrow $Q + ^3\text{O}_2$	$k_q^Q [^1\text{O}_2] [Q]$

Tabla 7.1: Vías de desactivación del $^1\text{O}_2$ y ecuaciones de velocidad correspondiente a cada una de ellas.

En una solución que contiene un sensibilizador de $^1\text{O}_2$ que está absorbiendo radiación, la velocidad de generación de $^1\text{O}_2$ viene dada por la ecuación:

$$d[^1\text{O}_2] / dt = \Phi_{\Delta}^{\text{Sens}} q_{p,\lambda}^v \quad (24)$$

donde $\Phi_{\Delta}^{\text{Sens}}$ es el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ del sensibilizador y $q_{p,\lambda}^v$ es la intensidad de luz absorbida por la muestra.

Para evaluar la eficiencia de la desactivación de $^1\text{O}_2$ por Lum, se emplearon técnicas cinéticas resueltas en el tiempo.

7.3.2 Descripción del equipo usado en las determinaciones resueltas en el tiempo

Para estas determinaciones se utilizó el sistema de láser de nanosegundo (ns) descrito en la Sección 7.2.2. Dependiendo del pH de la solución a irradiar, se realizaron los experimentos excitando la muestra a 355 nm, o luego de hacer pasar el haz de salida por la celda Raman, con λ de 309 nm (Figuras 7.8 y 7.9). La señal fosforescente del $^1\text{O}_2$ emitida desde la muestra se registró con un detector de Germanio enfriado con nitrógeno líquido (*North Coast EO-817P*) posicionado a un ángulo de 90° respecto del haz del láser (Figuras 7.8 y 7.9). Para incrementar la eficiencia de colección de la señal, se colocó un espejo parabólico por detrás de la celda de cuarzo conteniendo la solución de Lum. Luego de la ventana del detector, se colocó un filtro *Si-filter* (*CVI optics*) que ayuda a remover la luz visible, conjuntamente con otro filtro de banda (1270 nm *bandpass filter*, de 50 nm de ancho de banda) para aislar la señal deseada, correspondiente a la emisión fosforescente del $^1\text{O}_2$.

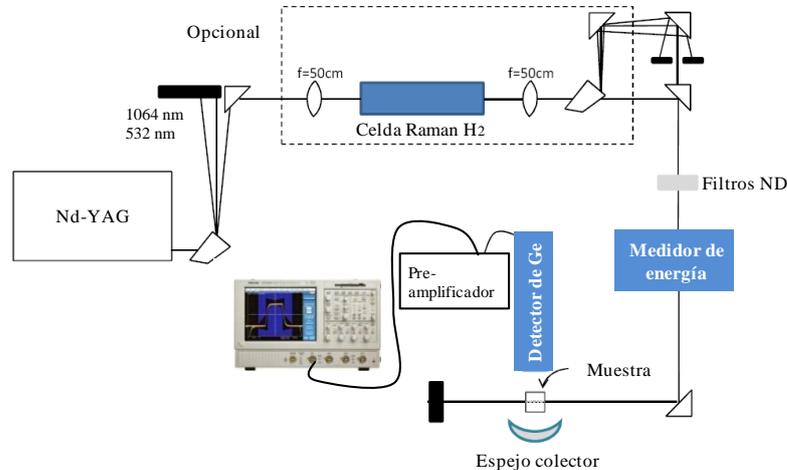


Figura 7.8: Esquema del sistema utilizado para las medidas de oxígeno singlete resueltas en el tiempo.

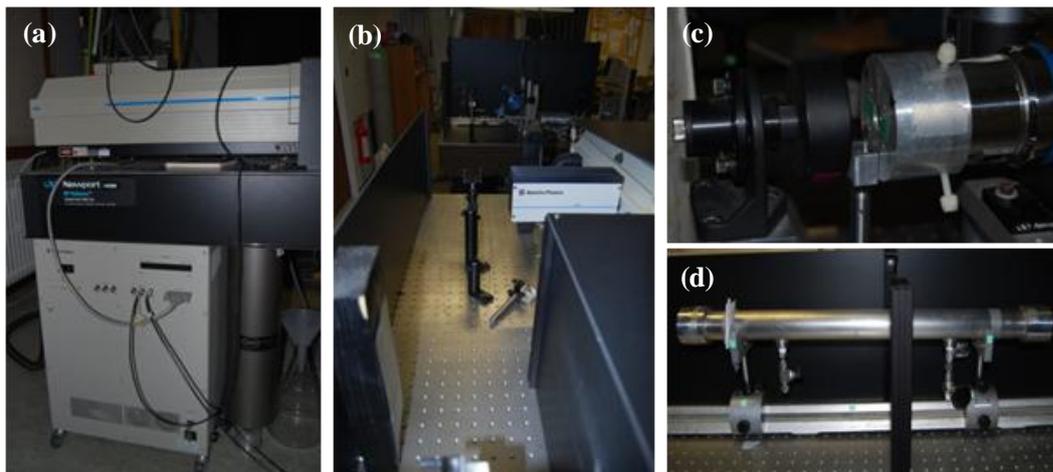


Figura 7.9: Fotografías del equipo utilizado para la determinación de $^1\text{O}_2$. (a) Láser Nd:YAG (Quanta-Ray GCR 230). (b) Vista de la trayectoria del haz de salida hasta alcanzar el prisma que lo enfoca hacia la celda conteniendo la muestra de análisis. (c) Detector de Germanio ubicado en posición de medida (frente al porta celda y al espejo parabólico colector). (d) Celda Raman de H_2 .

7.3.3 Determinación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete por Lumazina

El rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) se define como la fracción de moléculas de $^1\text{O}_2$ producidas por cada cuanto de luz absorbido por el sensibilizador. Para determinar el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ por Lum, $\Phi_{\Delta}^{\text{Lum}}$, se irradiaron soluciones de Lum (disueltas en D_2O) con el sistema de láser descrito en la sección anterior.

En líneas generales, el comportamiento cinético de la fosforescencia del $^1\text{O}_2$ observada se puede describir en términos de dos funciones exponenciales; una que da cuenta del decaimiento del estado triplete, k_{T} , dominado por la desactivación por oxígeno en estado fundamental ($^3\text{O}_2$) y otra que da cuenta del decaimiento propio del $^1\text{O}_2$, descrito por la constante de velocidad de desactivación k_{d} .

En la mayoría de los solventes, el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ es largo comparado con el tiempo de vida del estado triplete. Por lo tanto, la dependencia con el tiempo de la concentración de $^1\text{O}_2$ se reduce a una función mono-exponencial.

Para cuantificar la producción de $^1\text{O}_2$, Φ_{Δ} , se monitorea la intensidad de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ a un determinado tiempo. El rendimiento cuántico de fosforescencia del $^1\text{O}_2$, Φ_{p} , se puede expresar como el producto del rendimiento cuántico de producción

de $^1\text{O}_2$, Φ_Δ , y la fracción de moléculas de $^1\text{O}_2$ que decaen radiativamente, expresada en términos de la constante radiativa, k_e , y el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ en el solvente dado, τ_Δ ^{10,11}:

$$\Phi_p = \Phi_\Delta \cdot k_e \cdot \tau_\Delta \quad (25)$$

Entonces, la intensidad de la fosforescencia del $^1\text{O}_2$ es directamente proporcional a la concentración de $^1\text{O}_2$ a ese tiempo. Debido a que se desconoce el factor de proporcionalidad, para un determinado sensibilizador, $\Phi_\Delta^{\text{Sens}}$ se determina por comparación de la intensidad de la señal fosforescente extrapolada a cero (factor pre-exponencial A) observada para el sensibilizador con la correspondiente señal observada al irradiar un estándar o referencia cuyo rendimiento cuántico, Φ_Δ^{Ref} , sea perfectamente conocido.^{12,13} Para minimizar errores debidos a fluctuaciones en la energía del láser a lo largo del experimento, se grafica el factor pre-exponencial (corregido por la fracción de luz absorbida y el tiempo de vida del oxígeno singlete en cada solución) en función de la energía del láser tanto para la muestra como para la referencia. La relación entre ambas pendientes es proporcional a la relación de rendimientos cuánticos, por lo que de allí se puede calcular el Φ_Δ de la muestra desconocida:

$$\Phi_\Delta^{\text{Sens}} = \Phi_\Delta^{\text{Ref}} \frac{A^{\text{Sens}} \tau_\Delta^{\text{Ref}} (1-10^{-A^{\text{Ref}}})}{A^{\text{Ref}} \tau_\Delta^{\text{Sens}} (1-10^{-A^{\text{Sens}}})} \quad (26)$$

siendo A y τ_Δ , el factor pre exponencial (intensidad de fosforescencia extrapolada a cero) y el tiempo de vida de $^1\text{O}_2$, respectivamente, obtenidos de la señal de emisión a 1270 nm. El factor $[(1 - 10^{-A^{\text{Ref}}}) / (1 - 10^{-A^{\text{Sens}}})]$, se origina por la diferente cantidad de fotones absorbidos por la muestra y por la referencia, el cual en nuestros experimentos resultó ser muy similar a uno, debido a que se trabajó con valores de absorbancia de ambos muy similares. A su vez, si la muestra bajo estudio y el estándar están disueltos en diferentes solventes, para determinar correctamente el valor de $\Phi_\Delta^{\text{Sens}}$ debe aplicarse una corrección que tenga en cuenta la dependencia del rendimiento cuántico de fosforescencia de $^1\text{O}_2$ con la naturaleza química del solvente, k_e , τ_Δ , y la eficiencia de colección de la luz emitida debida a la diferencia en los índices de refracción, n.¹⁴

En los experimentos descriptos en este trabajo de tesis se usó, como compuesto de referencia, el ácido perinaftenona-2-sulfónico, PNS, que tiene un $\Phi_\Delta = 0,97 \pm 0,06$.¹⁵

Todas las señales de fosforescencia registradas mostraron una cinética de decaimiento monoexponencial.

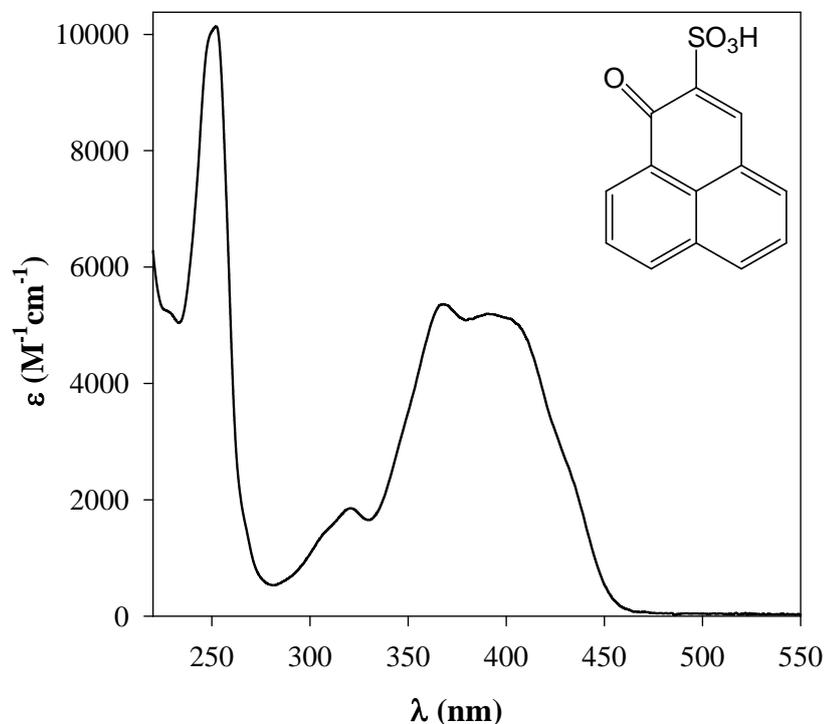


Figura 7.10: Espectro de absorción y estructura química del ácido perinaftenona-2-sulfónico, PNS, sensibilizador de $^1\text{O}_2$ usado como referencia ($\Phi_{\Delta} = 0,97 \pm 0,06$).

7.3.4 Determinación de la constante de velocidad de desactivación total de oxígeno singlete por Lumazina

La constante k_t^Q da cuenta de la magnitud de los procesos de desactivación que tienen lugar debido a la presencia de un desactivador (Q). Esto es, los procesos de desactivación química y física descritos en la Tabla 7.1; es decir:

$$k_t^Q = k_r^Q + k_q^Q \quad (27)$$

donde k_r^Q y k_q^Q son las constantes de velocidad de desactivación de $^1\text{O}_2$ por reacción química y por desactivación física, respectivamente.

Experimentalmente, k_t^Q se puede determinar mediante diferentes métodos o técnicas. En este trabajo de tesis k_t^Q se cuantificó monitoreando la fosforescencia de $^1\text{O}_2$ resuelta en el tiempo. Las determinaciones se realizaron con el sistema láser ns descrito en la Sección 7.3.2. En particular, la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) usada fue 416

nm. Para lograr esta λ_{exc} se seleccionó la primera línea de Stokes obtenida luego de hacer pasar el tercer armónico del haz del láser Nd-YAG a través de la celda Raman de H₂ tal como se muestra en la Figura 7.8. Como sensibilizador de ¹O₂ se utilizó PNS, que tiene una absorbancia apreciable a la longitud de onda de excitación.

Se preparó una solución acuosa de PNS, en una condición de pH definida, a la que se le agregaron cantidades crecientes y conocidas del desactivador que, en este caso, fue Lum.

Cuando se agrega un desactivador, el tiempo de vida del ¹O₂ observado τ_{Δ} es:

$$k_{obs} = 1 / \tau_{\Delta} = k_d + k_t^Q [Q] \quad (28)$$

Fácilmente, la ecuación anterior puede expresarse como la ecuación de Stern-Volmer para la desactivación de un estado excitado:¹⁶

$$1 / \tau_{\Delta} = 1 / \tau_{\Delta}^0 + k_t^Q [Q] \quad (29)$$

donde τ_{Δ}^0 y τ_{Δ} es el tiempo de vida del oxígeno singlete en ausencia y en presencia de desactivador, respectivamente. Por lo tanto, graficando la inversa del tiempo de vida del ¹O₂ observado (τ_{Δ}) a medida que se incrementa la concentración Q, se obtiene una línea recta, cuya pendiente es igual a k_t^Q .

7.3.5 Caracterización del estado excitado triplete de Lumazina en medio ácido

Los experimentos se realizaron sobre soluciones acuosas aireadas usando D₂O como solvente.¹⁷ Al excitar la muestra con $\lambda = 309$ nm, se observa una señal (correspondiente a la emisión de fosforescencia del oxígeno singlete) que aumenta hasta un valor máximo desde el cual, posteriormente, decae hasta alcanzar la línea de base (Figura 7.11).

Considerando que la emisión a 1270 nm observada, corresponde al ¹O₂ formado como consecuencia de una transferencia de energía entre ³Lum* y el O₂; la porción ascendente de la señal corresponde al decaimiento del ³Lum*, y la parte descendente de la de la misma da cuenta de la desactivación del ¹O₂

El comportamiento biexponencial de las señales fue ajustado por la ecuación 30:

$$I = A_1 e^{-t/\tau_{\Delta}} - A_2 e^{-t/\tau_t} \quad (30)$$

donde I es la señal registrada por el detector de NIR, que es proporcional a la concentración de $^1\text{O}_2$. A_1 y A_2 son los factores pre-exponenciales, τ_Δ y τ_T son los tiempos de vida del $^1\text{O}_2$ y el $^3\text{Lum}^*$, respectivamente.

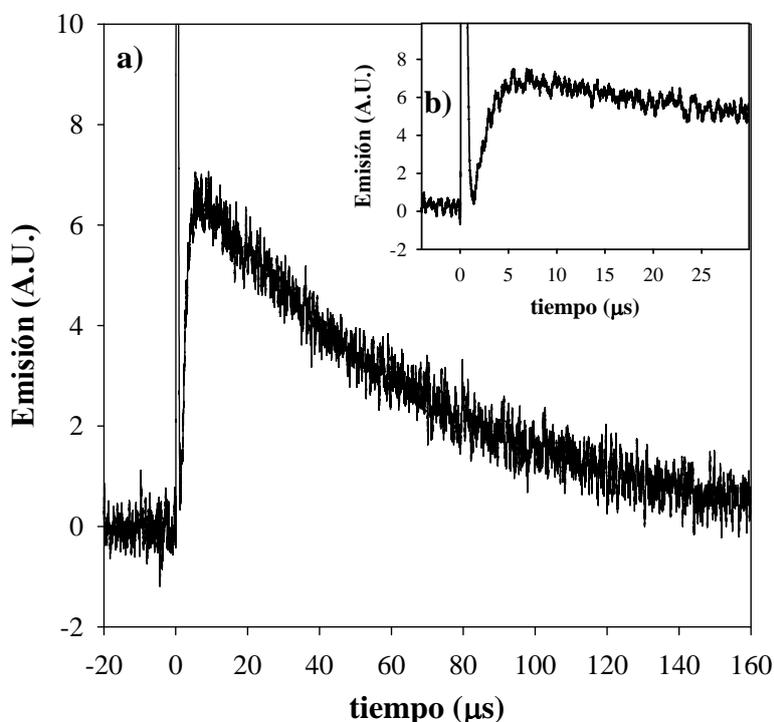


Figura 7.11: Variación de la emisión a 1270 nm en función del tiempo. $pD = 5,5$; $\lambda_{exc} = 309$ nm. a) Señal tomada en la escala 20 μs / división. b) Señal tomada en la escala 4 μs / división.

7.4 Estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica

La Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR, por su nombre en inglés, *Electronic Paramagnetic Resonance*), conocida también como Resonancia de Espín Electrónico, es la rama de la espectroscopía de absorción en la cual una radiación de microondas produce la transición entre niveles de energía magnética de electrones desapareados. Concretamente, EPR consiste en la aplicación de un campo magnético estático H que desdobra los niveles de energía de espín y de un campo magnético oscilante débil $H_1 \cos \omega t$ perpendicular a H ($H_1 \ll H$) con frecuencia en el rango de las microondas ($\nu \sim 10^{10}$ Hz). Esta radiación induce transiciones entre los distintos estados de espín.^{18,19}

A continuación se presenta una breve descripción de los principios y conceptos teóricos básicos de EPR junto con las posibles aplicaciones de esta técnica. Por último, se detalla el uso particular que se le dio a esta técnica en el contexto del presente trabajo de tesis.

7.4.1 Teoría básica de EPR: Introducción a la espectroscopia EPR

Los conceptos y conocimientos básicos en mecánica cuántica indican que las moléculas o los átomos tienen estados energéticos discretos, cada uno con su correspondiente valor de energía. Del mismo modo que para las técnicas descritas en los capítulos anteriores, la espectroscopía mide e interpreta la diferencia entre los distintos niveles de energía atómicos o moleculares. De esta manera, se logra un mayor conocimiento en la identificación, estructura y/o dinámica de los procesos bajo análisis.

Dicha diferencia de energía (ΔE) se puede medir o cuantificar sobre la base de la relación ya conocida entre ΔE y la absorción de la radiación electromagnética. De acuerdo a la ley de Planck:

$$\Delta E = h\nu \quad (31)$$

donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de la radiación incidente.

Por lo tanto, la absorción de energía produce una transición desde un estado energético de menor energía a otro estado de mayor energía (Figura 7.12a). En las espectroscopías convencionales, se hace un barrido de ν y aquellos valores de frecuencias donde se observa absorción corresponden a una diferencia de energía entre los estados electrónicos (en este sentido, y tal como se mostrará más adelante, EPR difiere ligeramente). El registro de estas transiciones/absorciones en un rango determinado de frecuencia se denomina espectro (Figura 7.12b). Típicamente, la frecuencia varía desde los MHz (en el caso de la Resonancia Nuclear Magnética o RMN) hasta la luz UV y visible. En el caso de los experimentos de EPR se utiliza radiación de frecuencia en el orden de los gigahertz (GHz).

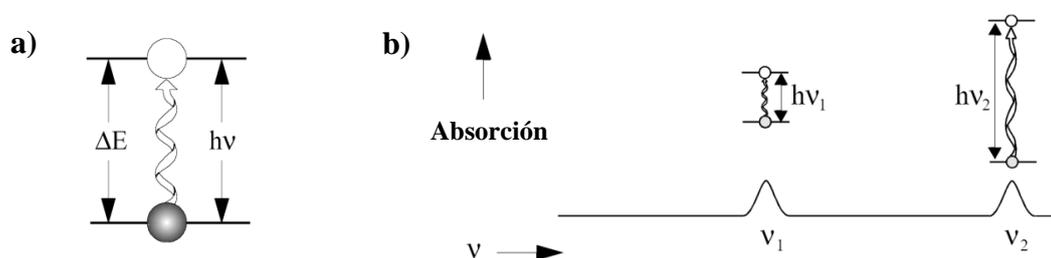


Figura 7.12: a) Transición asociada a la absorción de la radiación electromagnética. b) Representación esquemática de un espectro de absorción.

Tal como se describió al comienzo de este capítulo, las diferencias de energía que se miden o analizan en EPR corresponden, predominantemente, a la interacción de los

electrones desapareados presentes en la muestra con el campo magnético producido por un imán externo. Este fenómeno se lo conoce como *efecto Zeeman*. Debido a que el electrón tiene un momento magnético, puede actuar como una barra de imán cuando se la coloca frente a un campo magnético, H_0 . Consecuentemente, el electrón ocupará el nivel de menor energía cuando su momento, μ , esté alineado con la dirección del campo magnético. De manera opuesta, ocupará el nivel de mayor energía cuando μ este alineado en la dirección contraria al campo magnético (Figura 7.13). Estos dos estados energéticos se los denomina en términos de la proyección del momento de espín, M_s , en la dirección del campo magnético. Debido a que el electrón es una partícula con espín $1/2$, al estado con orientación paralela se lo denomina $M_s = -1/2$ y al estado de orientación antiparalela, $M_s = +1/2$.

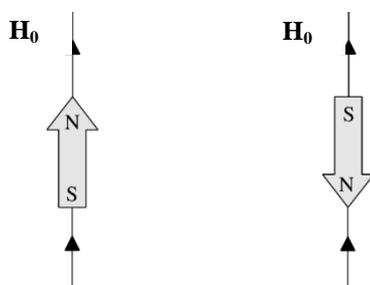


Figura 7.13: Energía de orientación mínima y máxima de μ con H_0 .

Las ecuaciones fundamentales de EPR se obtienen a partir de la mecánica cuántica:

$$E = g \cdot \mu_B \cdot H_0 \cdot M_s = \pm 1/2 g \cdot \mu_B \cdot H_0 \quad (32)$$

$$\Delta E = h\nu = g \cdot \mu_B \cdot H_0 \quad (33)$$

donde g es un factor de proporcionalidad que vale 2,0023 para el electrón libre. Sin embargo, puede variar dependiendo de la configuración electrónica del radical o del ión; μ_B es el magnetón de Bohr, unidad del momento magnético electrónico.

De las ecuaciones 32 y 33 se desprenden dos puntos muy importantes: (i) en ausencia de un campo magnético, los dos estados de espín tienen la misma energía y (ii) la energía de los estados de espín diverge, linealmente, a medida que aumenta la intensidad del campo magnético. Claramente, estos dos puntos tienen consecuencias muy importantes desde el punto de vista espectroscópico. Debido a que se puede modificar la diferencia de energías entre los estados de espín, variando H_0 , entonces se cuenta con un medio alternativo para obtener espectros de EPR. Por ejemplo, se puede aplicar un campo

magnético constante y hacer un barrido de frecuencias de la radiación electromagnética, tal como se hace en espectroscopía convencional.

De manera alternativa, se puede mantener constante la frecuencia de la radiación electromagnética y hacer un barrido o variación del campo magnético (Figura 7.14). De esta manera, aparecerá un pico en la absorción cuando el campo magnético se alinee o ajuste con los dos estados espines de modo tal que la diferencia de energía entre espines coincida con la energía de la radiación. Este campo magnético en particular se lo denomina “campo de resonancia”. Debido a las limitaciones de las microondas electrónicas, el último método descrito ofrece un mejor rendimiento.

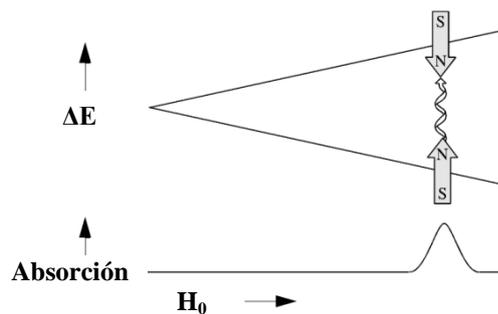


Figura 7.14: Variación de la energía de los estados de espín en función de la variación de la energía del campo magnético H_0 aplicado.

En un experimento típico de EPR se registra, a una frecuencia fija ν , la derivada de la intensidad de energía de microondas absorbida por la muestra respecto del campo magnético H . Los parámetros que caracterizan una señal de EPR son (Figura 7.15):

- ✓ la posición de la resonancia H_0 , de donde puede calcularse el valor de $g = h\nu/\mu_B H_0$.
- ✓ forma y ancho de línea pico a pico (ΔH_{pp}) de la resonancia.
- ✓ posibles estructuras de multiplete.

En un sistema magnéticamente concentrado, estos parámetros están determinados por la interacción del sistema de espines con el campo magnético H y por las interacciones entre espines de la red cristalina.

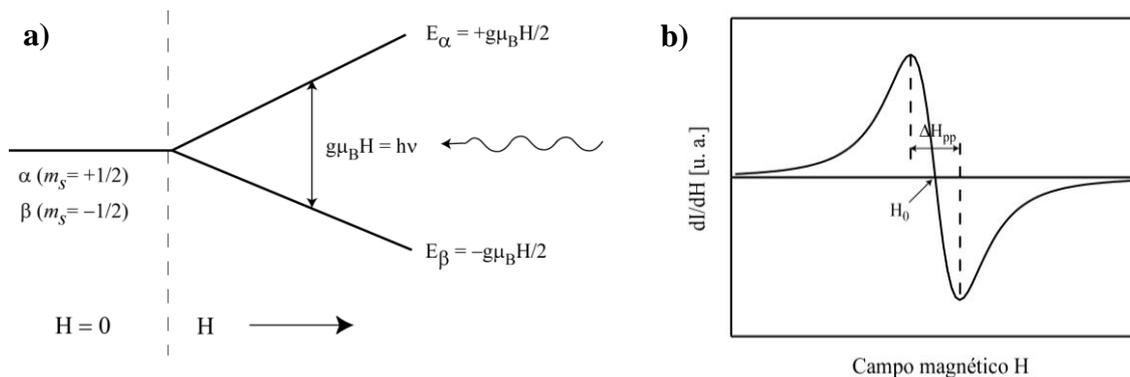


Figura 7.15: a) Separación de los niveles de energía de un doblete de Kramers en presencia de un campo magnético externo H creciente. b) Espectro típico de EPR, correspondiente a la derivada de la intensidad de energía absorbida por la muestra respecto al campo magnético aplicado H , en función de H . Se señalan la posición H_0 y el ancho de línea pico a pico ΔH_{pp} . u.a.: unidades arbitrarias.¹⁹

7.4.2 Descripción del equipo

La Figura 7.16²⁰ muestra un esquema de un espectrómetro de EPR básico. Los espectrómetros de EPR están diseñados para inducir y observar transiciones magnéticas entre los estados Zeeman de los espines desapareados, en presencia de un campo magnético estático.

Como cualquier espectrómetro, requiere de una fuente de radiación y de algún dispositivo que detecte absorción en la muestra. Como se detalló anteriormente, la diferencia más importante entre un espectrómetro de EPR y uno óptico es que los espectrómetros de EPR operan a frecuencia de microondas ν . En particular, el equipo opera en condiciones de ν fija y barre un espectro de EPR, modificando lentamente la intensidad del campo magnético estático aplicado hasta obtener la condición de resonancia. Cuando se cumple esa condición, se produce una absorción neta de energía por parte de la muestra.

El generador de microondas es una válvula electrónica denominada *klystron* y se acopla mediante una guía de ondas a la cavidad resonante en la que se coloca la muestra. Para asegurar la transferencia óptima de la potencia de microondas desde el *klystron* hacia la cavidad y desde la cavidad al detector se incorpora un circulador, normalmente de cuatro puertas, de manera de impedir que las ondas reflejadas en la cavidad puedan volver al *klystron*. De esta forma se asegura que toda la potencia de microondas reflejada por la muestra incida en el detector. La cavidad se acopla a la guía de ondas mediante un iris

cuyo diámetro efectivo se puede controlar con una punta metálica. Este mecanismo permite adaptar la impedancia del sistema a la de la cavidad, para permitir que toda la potencia incidente de la microonda sea absorbida por la cavidad. Cuando esto ocurre la cavidad está acoplada, la transferencia de energía es máxima y la frecuencia de resonancia de la cavidad coincide con la de la frecuencia de microonda. Durante el proceso de medición, el controlador automático de frecuencia (AFC) se encarga de mantener la frecuencia de emisión del *klystron* igual a la frecuencia natural de absorción de la cavidad. Cuando se produce la absorción de energía de microondas por la muestra, cambia la frecuencia natural de la cavidad y parte de la potencia que le llega es reflejada. En consecuencia cambia la cantidad de energía de microondas que llega al detector. Para detectar la señal de EPR con una máxima relación señal–ruido (es decir alta sensibilidad), se modula el campo magnético estático con un campo magnético oscilante a una frecuencia de 100 kHz, paralelo al campo estático, mediante bobinas adosadas a la cavidad. La potencia reflejada por la cavidad (que es proporcional a la energía absorbida por la muestra) llega al detector, se amplifica y se detecta mediante un detector sensible a fase. La salida de este detector sensible a fase es la derivada primera de la energía absorbida por la muestra respecto del campo magnético estático y puede registrarse en forma gráfica o digital mediante un sistema de adquisición electrónico de datos.

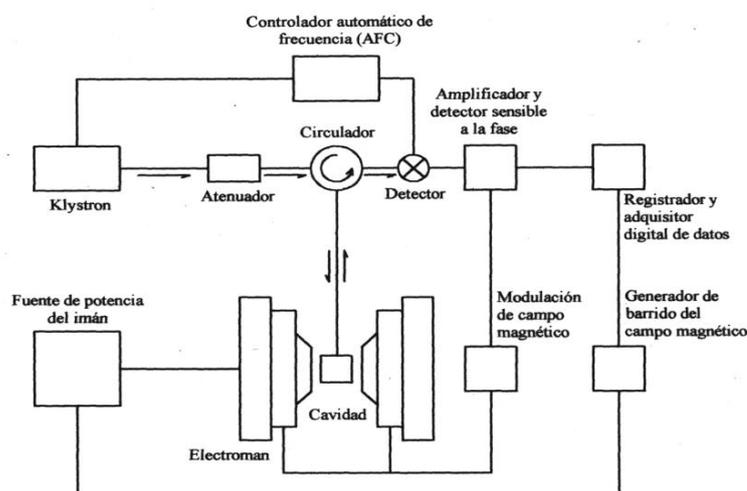


Figura 7.16: Esquema de un espectrómetro básico de EPR.^{19,20}

El espectrómetro utilizado en este trabajo de tesis fue el ELEXSYS E 500 (Bruker). Este equipo cuenta con una caja denominada “puente de microondas” en donde se encuentra la fuente de radiación electromagnética y el detector. La muestra se coloca en

una cavidad, que se encuentra en una caja metálica que ayuda a amplificar las señales más débiles provenientes de la muestra. El imán representado se usa para ajustar los niveles de energía de espín electrónico. La potencia de microondas fue de 20mW; la amplitud de modulación de campo de 0,1 mT; la frecuencia de modulación de campo de 100 kHz, y la frecuencia de microondas de 9,77 GHz. Mediante una computadora no solo se obtienen y procesan las señales del campo magnético, sino que también se regulan los diferentes parámetros necesarios para el funcionamiento del equipo. Para irradiar las muestras bajo análisis se utilizó una lámpara de mercurio *Oriel (Palaiseau, Francia)*.²¹

7.4.3 Aplicaciones de EPR

EPR es una técnica analítica no destructiva y no invasiva. A diferencia de otras técnicas analíticas, EPR brinda información muy valiosa desde el punto de vista estructural y dinámico, aún en procesos químicos o físicos en progreso, sin influenciar o modificar los mismos. Ciertamente, esta técnica es un muy buen complemento de otros métodos para desarrollar estudios y aplicaciones en una gran variedad de áreas del conocimiento. A continuación se detalla una breve lista de algunas de las aplicaciones más comunes de EPR: (i) *Química*: reacciones cinéticas radicalarias, reacciones de polimerización, *spin trapping*, compuestos organometálicos, catálisis, procesos de óxido-reducción, bi-radicales y estados tripletes de moléculas, etc. (ii) *Física*: medidas de susceptibilidad magnética, metales de transición, conducción electrónica en conductores y semiconductores, defectos cristalinos, campos cristalinos en monocristales, recombinación a baja temperatura, entre otros. (iii) *Química de materiales*: fotodegradación de pinturas y polímeros, propiedades de polímeros, defectos en diamante y fibras ópticas, conductores orgánicos, influencia de impurezas y defectos en semiconductores, propiedades de nuevos materiales magnéticos, compuestos C₆₀, corrosión por radicales libres, etc. (iv) *Biología y medicina*: técnicas *spin label* y *spin probes*, *spin trapping*, detección de radicales libres en tejidos y fluidos biológicos, evaluación de antioxidantes y sequestradores de radicales, agentes de contraste, detección de drogas, su metabolismo y toxicidad, estudio de reacciones enzimáticas, fotosíntesis, generación fotoquímica y/o radiolítica de radicales, detección de radicales derivados del oxígeno (radical hidroxilo, **anión superóxido**, etc.), detección de monóxido de nitrógeno en sistemas biológicos, entre otros.

7.4.4 Uso particular de EPR en el presente trabajo de tesis

Esta técnica se utilizó para evaluar la formación de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en las diferentes reacciones fotoquímicas y fotosensibilizadas estudiadas en esta tesis. Debido al tiempo de vida relativamente corto que presenta el $O_2^{\cdot-}$, fundamentalmente en presencia de sustratos fácilmente oxidables (como lo son los nucleótidos), suele presentar ciertas dificultades la detección directa de este radical. Por lo tanto, para llevar a cabo estas experiencias se recurrió al método de atrapamiento de espín o “*spin trapping*”. En esta técnica se usa una sustancia en particular (que denominaremos “secuestrador”). El secuestrador es una especie no radicalaria y, por lo tanto diamagnética, que presenta una elevada y selectiva reactividad con la especie radicalaria que se quiere detectar. En nuestro caso particular, el $O_2^{\cdot-}$. El secuestrador (diamagnético) reacciona con el radical, generando un producto también de naturaleza radicalaria (paramagnético). De esta forma, el producto, que presenta una vida media más largo, si puede ser detectado fácilmente por EPR.^{22,23}

La Figura 7.17a muestra la reacción descrita en el párrafo anterior, para el caso particular del *N*-óxido-5,5'-dimetil-1-pirrolina o DMPO²⁴ con el $O_2^{\cdot-}$. Por su parte, la Figura 7.17b muestra una señal de EPR típica del producto de reacción usada para detectar la presencia de $O_2^{\cdot-}$ en las mezclas de reacción estudiadas.

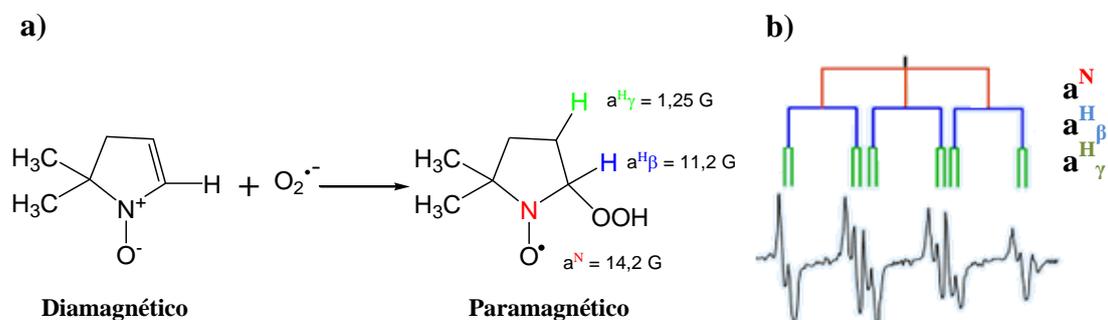


Figura 7.17: (a) Reacción química entre DMPO y anión superóxido. (b) Señal de EPR típica correspondiente al producto de reacción de la figura.

Se irradiaron soluciones de Lum (100 μM) y dAMP (200 μM) en presencia de DMPO (50 mM) disuelto en buffer Tris/HCl 1 mM y NaCl 0,5 mM (pH = 7,2), en celdas de cuarzo especiales, con camino óptico de 0,2 cm. Se tomaron espectros a distintos tiempos de irradiación, hasta observar un valor máximo de señal, el cual se mantiene constante. El espectro de EPR se caracterizó por las constantes de acoplamiento hiperfino

$a^N = 14,2$ G, $a^H_\beta = 11,2$ G, $a^H_\gamma = 1,25$ G correspondientes al aducto DMPO \cdot -OOH.²⁵ Se hicieron controles en ausencia de Lum (sólo dAMP), como así también controles en ausencia de dAMP (sólo Lum).

Para confirmar la participación del O $_2^{\cdot-}$ en la formación del aducto DMPO \cdot -OOH, experimentos similares se realizaron en presencia de 22 U/ml de la enzima superóxido dismutasa (SOD)^{26,27}, la cual como se mencionó en el Capítulo 5, elimina rápidamente el O $_2^{\cdot-}$ del medio, ya que cataliza su conversión a H $_2$ O $_2$ y O $_2$.

7.5 Referencias

- 1 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edition. Springer (2006)
- 2 R. T. Parker, R. S. Freeland, E. M. Schulman, R. B. Dunlap, *Analytical Chem.*, **1979**, 51(12), 1921-1926
- 3 A. Gilbert, J. Baggott, *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Science (1991)
- 4 D. F. Eaton, *Handbook of organic photochemistry*, ed. J. C. Scaiano, CRC Press, Boca Raton, Florida, capítulo 8, Eaton (1989)
- 5 S. R. Meech, D. Phillips, *J. Photochem.*, **1993**, 23, 193-217
- 6 M. Mardelli, J. Olmsted, *J. Photochem.*, **1977**, 7, 277-285
- 7 S. E. Braslavsky, *Pure Appl. Chem.*, **2007**, 79(3), 293-465
- 8 P. K. Frederiksen, M. Jørgensen, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 1215-1221.
- 9 T. Keszthelyi, D. Weldon, T. N. Andersen, T. D. Poulsen, K. V. Mikkelsen, P. R. Ogilby, *Photochem. Photobiol.*, **1999**, 70, 531-539
- 10 C. Schweitzer, R. Schmidt, *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 1685-1757
- 11 P. R. Ogilby, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, 32, 512-519
- 12 G. Valduga, S. Nonell, E. Reddi, G. Jori, S. Braslavsky, *Photochemistry and Photobiology*, **1988**, 48, 1., 1-5,
- 13 F. Wilkinson, W.P. Helman, A.B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1993**, 22, 113-262.
- 14 J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75, 991-1024
- 15 C. Marti, O. Jürgens, O. Cuenca, M. Casals, S. Nonell, *J. Photochem. Photobiol. A.*, **1996**, 97, 11-18
- 16 D. A. Holden, en *Handbook of organic photochemistry*, volumen I, capítulo 10, ed. J. C. Scaiano, CRC Press, Boca Raton, Florida (1987)
- 17 P. R. Ogilby and C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 3423-3430.
- 18 A. Abragam, *The Principles of Nuclear Magnetism*; Oxford University Press: London (1961)
- 19 A. Rizzi "Estudio de Interacciones Magnéticas y Estructura Electrónica en Complejos de Metales de Transición con Moléculas de Interés Biológico", Tesis doctoral, UNL, Santa Fe, Argentina (2003)
- 20 J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz, *Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*, John Wiley & Sons, Inc. New York (1994)
- 21 *Bruker User's manual: basic operations*. ELEXSYS E 500 (Bruker)
- 22 E. G. Janzen, *Acc. Chem. Res.*, **1971**, 4, 31-40
- 23 F. A. Villamena, J. L. Zweier, *Antioxid. Redox Signal.*, **2004**, 6619-629.
- 24 F. A. Villamena, *J Phys Chem A.*, **2010**, 114, 1153-60.
- 25 E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1980**, 200, 1-16
- 26 I. Fridovich, *Photochem. Photobiol.*, **1978**, 28, 733-741
- 27 E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102, 4994-4999

Capítulo 8

Preparación, cultivo y fototoxicidad sobre células HeLa

El presente capítulo describe los diferentes métodos y técnicas empleados en los experimentos realizados con células con el objeto de evaluar las propiedades fototóxicas de Lumazina. Los correspondientes resultados se presentarán en el capítulo 13.

8.1 Preparación y cultivo de células HeLa

Las células HeLa (Figura 8.1) son células eucariotas, tumorales, derivadas de epitelio humano. En particular, es una línea celular proveniente de un carcinoma cervical, producido por la invasión del virus del papiloma humano 18, extraído quirúrgicamente a la paciente Henrietta Lacks (de ahí el nombre). HeLa representa el primer tipo de células humanas de las cuales se logró obtener una línea celular permanente. Debido a la relativa facilidad con la que se pueden cultivar y con la que las mismas proliferan en cultivos celulares, han sido y siguen siendo ampliamente usadas en investigación.

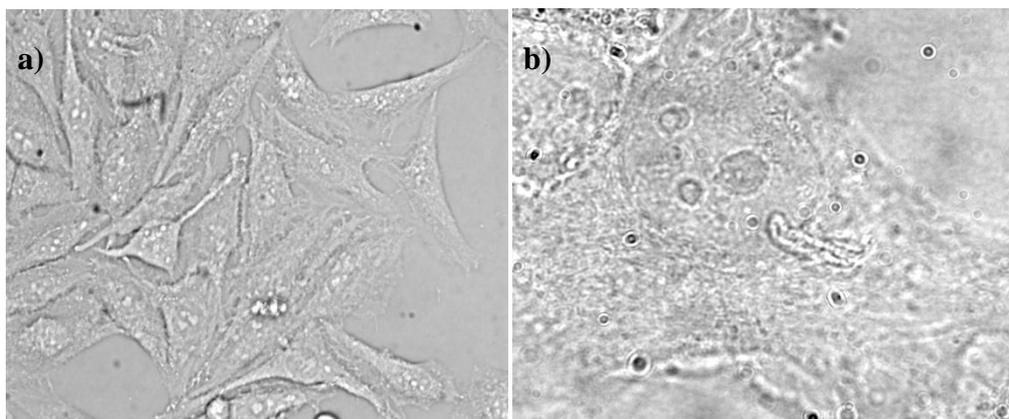


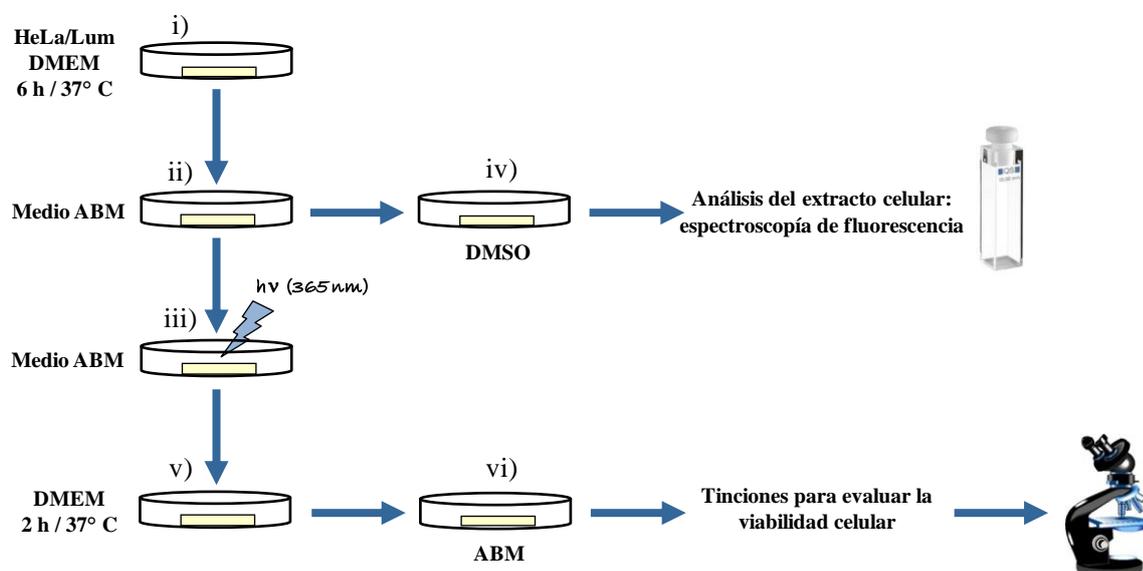
Figura 8.1: Imágenes de células HeLa registradas con un microscopio de campo claro con objetivos de a) 20X y b) 100X.

Las células HeLa usadas a lo largo de este trabajo de tesis se prepararon y manipularon siguiendo el método descrito en la literatura.¹ Brevemente, las células se hicieron crecer en un incubador con atmósfera controlada de CO₂, a 37 °C. Para tal fin se utilizó un medio de cultivo y crecimiento estándar (*Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino y los antibióticos penicilina y estreptomicina. Posteriormente fueron depositadas sobre portaobjetos recubiertos con poli-D-lisina; y luego de 24 horas de incubación, tiempo necesario para la correcta fijación de

las células al portaobjetos, las células estuvieron listas para ser utilizadas en los diferentes experimentos que se describirán en el Capítulo 13.

8.2 Incubación de células HeLa con Lumazina

Para realizar los experimentos en presencia de Lum, se tomaron células crecidas sobre portaobjetos en recipientes conteniendo 2 ml de medio DMEM, y se les agregó 200 μL de solución acuosa de Lum (0,45 o 2,20 mM, según el experimento) (Esquema 8.1, etapa i). A continuación, las células fueron incubadas durante 6 hs a 37 °C en atmósfera controlada de CO₂. Luego de la incubación, las células fueron lavadas dos veces con 2 ml de un medio artificial llamado “*Artificial Balanced Medium*” (ABM) (etapa ii). El medio ABM es una solución acuosa de 140 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 1,25 mM NaH₂PO₄, 10 mM glucosa y 10 mM de buffer HEPES (osmolaridad = 310 mosmol l⁻¹, pH = 7,4). En todos los casos, la densidad celular fue de aproximadamente 500-800 células/mm². En este punto, las células estuvieron listas para ser utilizadas en los ensayos de irradiación, o para la posterior lisis y extracción.



Esquema 8.1: Esquema representativo de la secuencia de etapas llevadas a cabo en los ensayos de fototoxicidad de células HeLa por Lumazina.

8.3 Estudio de la captación del fotosensibilizador por células HeLa: preparación y análisis de los extractos celulares

Las células incubadas en medio DMEM en presencia o ausencia de Lum (Esquema 8.1, etapa i) se lavaron dos veces con medio ABM (etapa ii); el cual fue removido antes del lisado de las células. Dicho lisado se realizó agregando 400 μ l de DMSO (etapa iv). Luego de 2 minutos, se colocó el extracto obtenido en una celda de cuarzo (1 cm camino óptico) conteniendo 2 ml de H₂O y se procedió al análisis por espectrofluorimetría. Para esta última determinación se empleó el equipo III descrito en el Capítulo 7. Se registraron espectros tridimensionales excitando la muestra en un rango de λ comprendido entre 200 y 400 nm, y observando la emisión entre 350 y 600 nm.

8.4 Irradiación

Para evaluar el efecto fotodinámico de Lum, los portaobjetos conteniendo las células en medio ABM fueron irradiados durante diferentes intervalos de tiempo, en condiciones de temperatura ambiente (etapa iii). El sistema de irradiación usado se esquematiza en la Figura 8.2. En particular, se irradió con una lámpara de estado estacionario UV-A (365 ± 20 nm), *Spectroline* 4W, modelo ENF-240C, (*Spectronics corporation*). Para incrementar la cantidad de radiación incidente sobre la muestra, por un lado se interpuso entre la lámpara y el portaobjetos con las células una lente planoconvexa, y por debajo de la muestra se adicionó un espejo parabólico cuya función fue la de reflejar una mayor cantidad de radiación. Empleando este dispositivo, la energía de la radiación incidente sobre las células fue de ~ 2 mW/cm² medida con un radiómetro *fieldMax-TO, Coherent*.

Luego de la irradiación, se procedió a cambiar el medio ABM, nuevamente por medio de crecimiento DMEM para poder así, incubar nuevamente a las células durante 2 h at 37 °C (etapa v). Cabe aclarar que las irradiaciones no se pueden realizar sobre medio DMEM debido a que éste tiene presente, como parte de su composición, un indicador de pH (rojo de fenol) el cual es capaz de absorber la radiación incidente, compitiendo así con el fotosensibilizador (Lum).

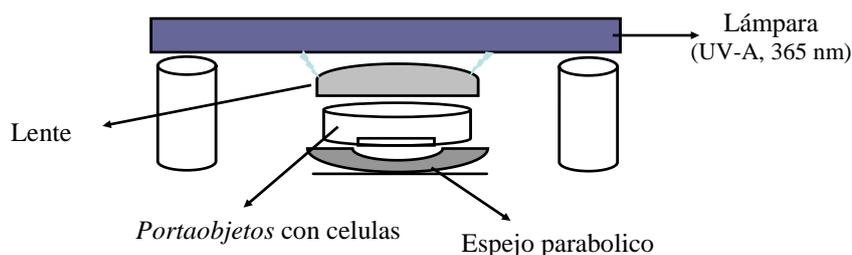


Figura 8.2: Esquema del sistema de irradiación utilizado en los experimentos de fotosensibilización de células HeLa.

8.5 Evaluación de la fototoxicidad

Con el objeto de investigar las propiedades fototóxicas de Lum, se realizaron dos ensayos que permiten evaluar la viabilidad celular: Rodamina 123 y Azul de tripano. Ambos ensayos se realizaron sobre distintas poblaciones celulares a las que llamamos: *(i)* control celular: células crecidas en ausencia de Lum y no irradiadas; *(ii)* control oscuridad: células crecidas en presencia de Lum y no irradiadas; *(iii)* control luz: células crecidas en ausencia de Lum e irradiadas; *(iv)* luz + Lum: células crecidas en presencia de Lum e irradiadas. En este último caso, se trabajó con soluciones *stock* de Lum de dos concentraciones diferentes (0,45 y 2,20 mM) y los cultivos fueron irradiados durante diferentes períodos de tiempo.

8.5.1 Ensayos con Rodamina 123

Rodamina 123 (Rh123) (Figura 8.3) es un colorante fluorescente extensamente utilizado en un gran número de aplicaciones biotecnológicas tales como microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, ELISA, etc.

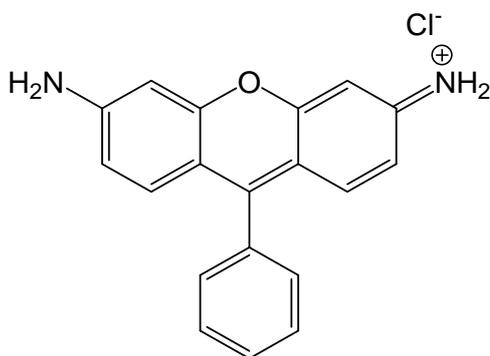


Figura 8.3: Estructura química del 2-(6-amino-3-imino-3H-xanthen-9-il) metil éster del ácido benzoico o Rodamina123 (Rh123).

Una aplicación particular de esta coloración, está relacionada con la capacidad que presenta este compuesto para acumularse, principalmente, en las mitocondrias de las células vivas como resultado del potencial trans-membrana.^{2,3} De esta manera, se utiliza como marcador fluorescente capaz de brindar información acerca de la funcionalidad de estas organelas. Al teñir los cultivos con Rh123, la manifestación de una célula viva, es una imagen fluorescente en la cual la mitocondria está resuelta y el núcleo no contiene fluoróforo, tal como se muestra en la Figura 8.4a). Al perder la célula el potencial trans-membrana, se produce una deslocalización del fluoróforo Rh123; razón por la cual en una célula muerta la fluorescencia de la Rh123 es difusa, y se puede originar en parte en el núcleo, donde finalmente tiende a localizarse (Figura 8.4c)). Las células que han estado comprometidas a algún tipo de estrés o daño, presentan fluorescencia difusa por lo que no pueden resolverse las mitocondrias, aunque el núcleo puede aún aparecer en algunas zonas oscuro (Figura 8.4b))⁴.

Para realizar la tinción con el colorante Rh123, se procedió en primera instancia a remover el medio de incubación DMEM, para luego agregar 2 ml de solución de ABM (etapa vi) y 3 μ l de Rh123 (25 μ M). Se incubó durante 30 minutos. La fluorescencia de la Rh123 se monitoreó mediante experimentos de imagen (λ de excitación = 480 nm, λ de detección = 535 nm). De esta manera, se obtuvieron imágenes típicas como las que se muestran en la Figura 8.4.

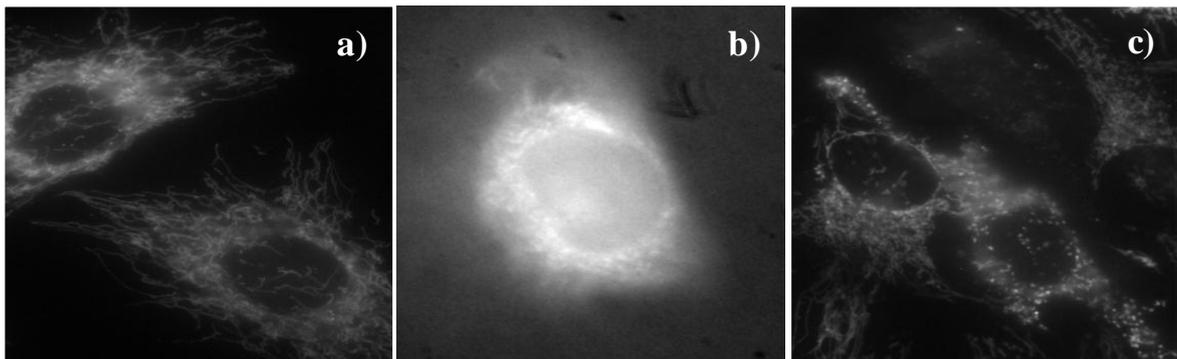


Figura 8.4: Imágenes de células HeLa, previamente teñidas con Rh123, obtenida por microscopía de fluorescencia, con objetivo 100X: a) célula funcional, con mitocondrias estructuralmente intactas. b) y c) Células con mitocondrias morfológicamente alteradas.

8.5.2 Ensayos de exclusión con azul de tripano

Azul de Tripano (o TB, del inglés *Trypan Blue*) es un colorante del tipo “diazó”, derivado de la toluidina (Figura 8.5). Este colorante se usa comunmente para teñir, de manera selectiva, tejidos o células muertas. Aquellas células o tejidos que se encuentren vivos con la composición de sus membranas intactas no serán coloreados por TB. Esto es consecuencia de la elevada selectividad que presentan las membranas celulares respecto de los compuestos que las atraviesan. Sin embargo, el TB puede atravesar fácilmente la membrana de células o tejidos muertos o comprometidos. De esta manera, cuando las células son tratadas con este colorante, únicamente las células muertas se verán bajo el microscopio teñidas de color azul. Debido a que el colorante es excluido de las células vivas, a éste método de tinción se lo denomina “método de exclusión por TB”.

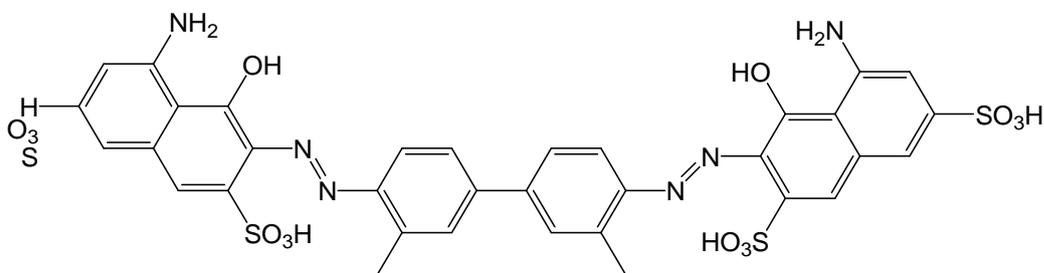


Figura 8.5: Estructura química del (ácido 3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-di-il)di(1Z)hidrazin-2-il-1-yliden]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftalen-2,7-disulfónico) o simplemente, Azul de tripano (TB).

En los ensayos de exclusión realizados en este trabajo de tesis se procedió tal como se describe a continuación: a cada portaobjeto sumergido en 200 µl de medio artificial ABM se le agregó 400 µl de solución acuosa de TB (0,5 mg / ml). Luego de 2 minutos de incubación se cuantificó el número de células vivas y muertas analizando las imágenes registradas por microscopía de campo claro (Figura 8.6).

8.5.3 Microscopía

Las imágenes obtenidas en los ensayos de fototoxicidad de Lum sobre células HeLa fueron registradas usando el microscopio invertido *Olympus IX70* que se muestra en la Figura 8.7.^{5,6} Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron irradiando la muestra (células y sus alrededores) con una lámpara de halógeno-tungsteno a la que se le intercalaron los filtros de banda necesarios para seleccionar la longitud de onda de excitación apropiada

para la Rh123 (480 nm). La luz emitida por la muestra se detectó a través de un filtro de banda (centrado en 535 nm), usando un cámara CCD refrigerada (*Evolution QEi controlled by ImageProsoftware, Media Cybernetics*) colocada en el plano de imagen del microscopio. Por otra parte, las imágenes en campo claro registradas en los ensayos con TB fueron tomadas con la misma cámara CCD.

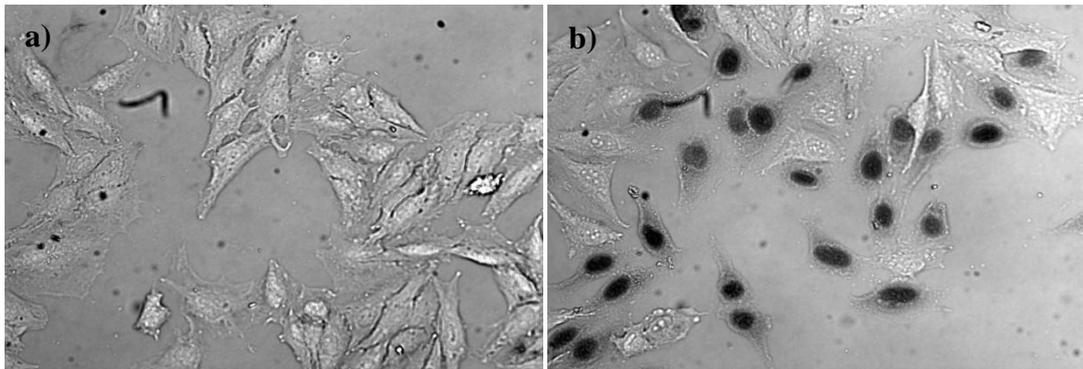


Figura 8.6: Imágenes de células HeLa, previamente teñidas con TB, obtenida por microscopía, con objetivo 20X: a) células funcionales, con membranas cuya permeabilidad no está alterada, y b) células muertas con permeabilidad de membrana alterada.



Figura 8.7: Fotografía del microscopio *Olympus IX70* usado en este trabajo de tesis.

8.5.4 Análisis estadístico

Una vez tomadas las imágenes en el microscopio, se procedió a realizar el conteo y posterior clasificación de las células en vivas, muertas o comprometidas, tal como se describió en las secciones anteriores. Se contaron al menos 15 campos con

aproximadamente 50 células cada uno, por lo que como mínimo se contaron 600 células en cada población. Se graficó el porcentaje de células vivas, muertas o comprometidas presentes en cada campo, junto con su respectiva desviación estándar.

Se realizó el análisis estadístico mediante el uso del test ANOVA unidireccional, con el objeto de poder asegurar que estadísticamente existe diferencia significativa entre la cantidad de células vivas y muertas en las poblaciones tratadas respecto a la cantidad de las mismas presente en los controles.⁷

8.6 Referencias

-
- 1 S. Hatz, J. D. C. Lambert, P. R. Ogilby, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, 6, 1106-1116
 - 2 Z. Darzynkiewicz, G. Juan, X. Li, W. Gorczyca, T. Murakami, F. Traganos, *Cytometry*, **1997**, 27, 1-20.
 - 3 L.V. Johnson, M. L. Walsh and L. B. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 990-994
 - 4 T. Breitenbach, M. K. Kuimova, P. Gbur, S. Hatz, N. B. Schack, B. W. Pedersen, J. D. C. Lambert, L. Poulsen and P. R. Ogilby, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2009**, 8, 442-452
 - 5 E. Skovsen, J. W. Snyder, J. D. C. Lambert, P. R. Ogilby, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 8570-8573
 - 6 J. W. Snyder, E. Skovsen, J. D. C. Lambert, P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14558-14559
 - 7 NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, date

Capítulo 9

Propiedades fotofísicas de Lumazina

Como ya se mencionó en el Capítulo 3, el doble anillo de Lumazina (Lum) presenta grupos disociables en su estructura. Debido a esto, según el pH de la solución, Lum presenta más de una forma ácido-base. En el intervalo de pH comprendido entre 4 y 12, se observa un único equilibrio ácido-base (Figura 9.1). En dicho equilibrio, el grupo amida se transforma en fenolato al aumentar el pH. En adelante se mencionará a la especie neutra como “forma ácida”, y a la especie monoaniónica como “forma alcalina”. Estas formas ácido-base presentan características fotoquímicas y fotofísicas diferentes, siendo imprescindible conocer cuál de ellas está presente en cada una de las condiciones experimentales.

En este capítulo se exponen los resultados del análisis y caracterización fotofísica de los estados electrónicamente excitados singlete y triplete de Lumazina ($^1\text{Lum}^*$ y $^3\text{Lum}^*$, respectivamente). Para ello, se emplearon las técnicas de *Time Correlated Single Photon Counting* para el análisis de la emisión de Lum y estudios de láser para el análisis del $^3\text{Lum}^*$.

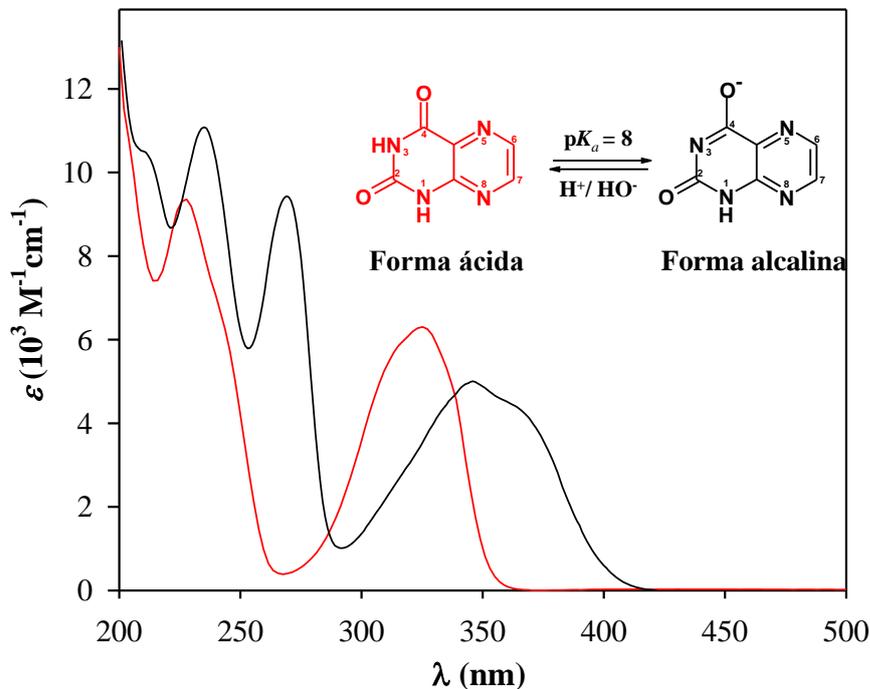


Figura 9.1: Equilibrio ácido-base de Lumazina y espectros de absorción de la forma ácida (—) y de la forma alcalina (—)

9.1 Espectros de absorción y constantes de disociación ácida

La Figura 9.1 muestra los espectros correspondientes a las formas ácida y alcalina (pH = 5,5 y 10,5, respectivamente) de Lum. La forma ácida presenta dos bandas de absorción, una en la región comprendida entre 210 y 250 nm ($\lambda_{\text{max}} = 228$ nm) y otra banda entre 280 y 350 nm ($\lambda_{\text{max}} = 324$ nm). En la forma alcalina se observan tres bandas siendo la posición de los máximos 235 nm, 270 nm y 346 nm. El hecho de que ambas formas ácido-base presenten absorción a longitudes de onda por encima de 300 nm, implica que por exposición a la luz solar, se generen estados electrónicamente excitados.

Para la determinación de la constante de disociación ácida (K_a), del equilibrio ácido-base representado en la Figura 9.1, se recurrió a la técnica de titulación espectrofotométrica descrita en el Capítulo 6. En la Figura 9.2a se muestran los espectros de absorción registrados a distintos valores de pH. Asimismo, a modo de ejemplo, en la Figura 9.2b se representa la variación de la absorbancia (a 320 nm) con el pH. A partir de este tipo de curvas, se obtuvo el valor de K_a para cada longitud de onda y luego se calculó el valor promedio de dicha constante. Para este caso, se obtuvo un valor promedio igual a $1,09 \cdot 10^{-8}$, que representa un valor de pK_a de $7,96 \pm 0,06$.

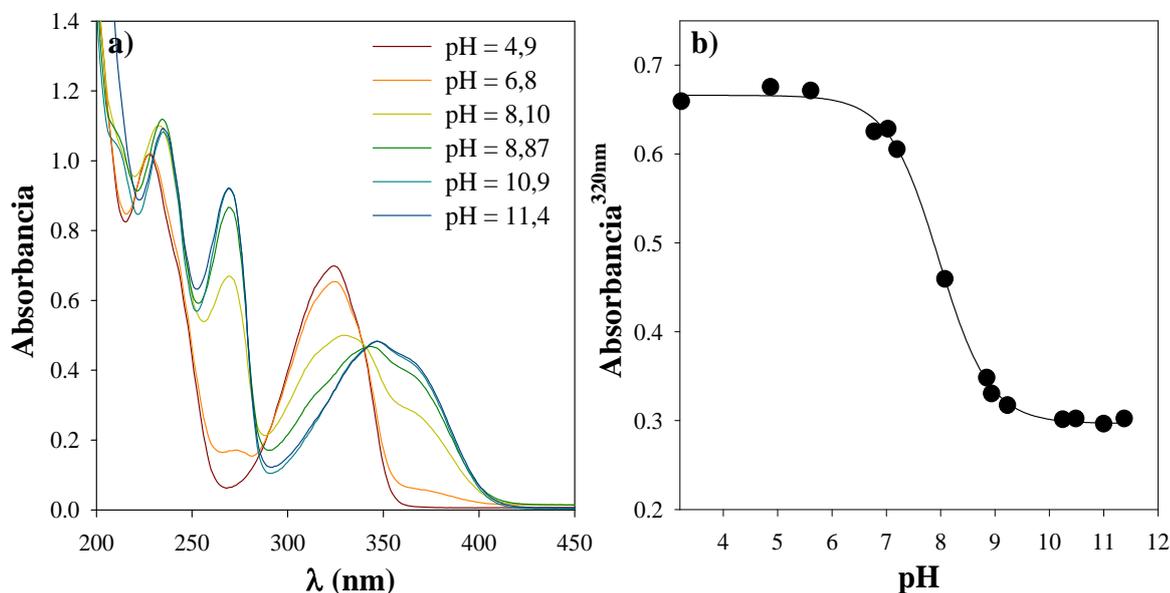


Figura 9.2: a) Variación del espectro de absorción de Lum en solución acuosa (100 μM) con el pH. Camino óptico: 1 cm. b) Curva de titulación a 320 nm para una solución de Lum (100 μM). La línea representa el ajuste realizado con la ecuación 3 del Capítulo 6.

9.2 Fluorescencia de Lumazina y caracterización de su primer estado excitado singlete

9.2.1 Espectros de emisión

Se registraron los espectros de emisión de Lum en solución acuosa a diferentes pH, de forma tal que solo una forma ácido-base esté presente en la solución. Para ello se utilizó el equipo III descrito en el Capítulo 7. Los espectros se obtuvieron por irradiación en la zona correspondiente a la banda de absorción de menor energía ($\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$ y 350 nm para las formas ácida y alcalina, respectivamente). En la Figura 9.3 se muestran los espectros de emisión normalizados en los cuales se aprecia una banda con un máximo de emisión alrededor de los 460 nm . Puede observarse un pequeño corrimiento batocrómico de la banda de emisión de la forma ácida respecto de la correspondiente a la forma alcalina ($\lambda_{\text{em}} \text{ máximo} = 474 \text{ nm}$ y 464 nm , respectivamente). Es interesante notar que mientras la diferencia entre los máximos de absorción de las dos formas ácido-base es de 22 nm , la diferencia en los máximos de emisión es de -10 nm . Esto se debe a que la forma ácida presenta un corrimiento de Stokes relativamente grande ($\sim 150 \text{ nm}$).

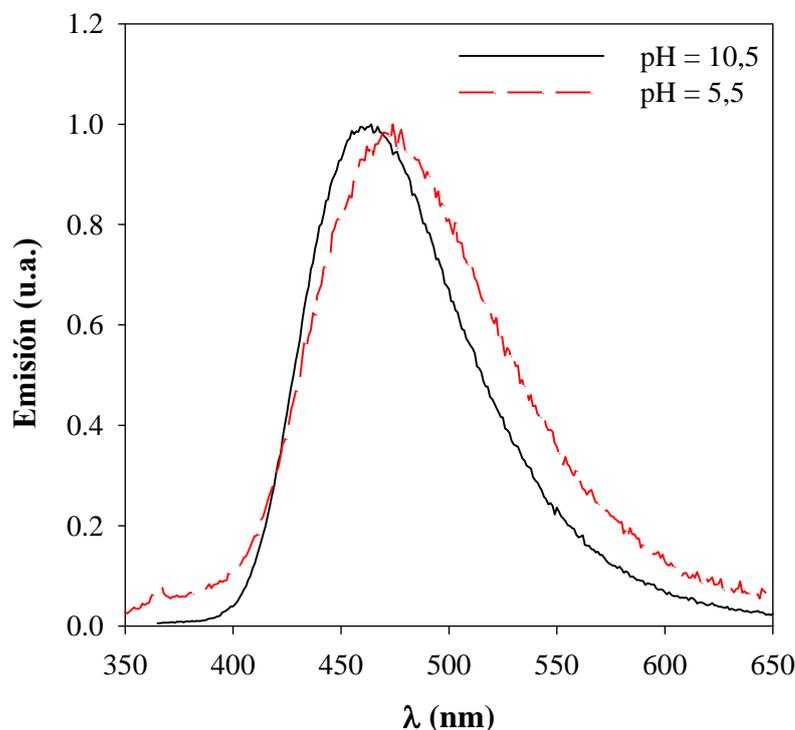


Figura 9.3: Espectros de emisión normalizados de Lum en solución: (- -) forma ácida (pH = 5,5; $\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$) y (—) forma alcalina (pH = 10,5; $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$).

Como se mencionó anteriormente (Sección 9.1), los espectros de absorción de Lum presentan dos o tres bandas según se trate de la forma ácida o alcalina, respectivamente. Esta característica indica que Lum es capaz de acceder a más de un estado singlete excitado cuando absorbe luz en la región comprendida entre 200 y 500 nm. Consecuentemente, se obtuvieron los espectros de emisión excitando a distintas longitudes de onda (λ_{exc}) (Figura 9.4); en particular, se fijaron los valores de λ_{exc} en base a la posición de los diferentes máximos en los espectros de absorción (Figura 9.1). En la Figura 9.4 se puede apreciar que todos los espectros de emisión normalizados son similares para cada una de las λ_{exc} estudiadas. Estos resultados sugieren que existe un único estado emisor independientemente de la longitud de onda de la radiación incidente. Es decir, que todos los estados electrónicamente excitados decaen por vías no radiativas al primer estado excitado singlete, el de menor energía, desde el cual ocurre la desexcitación radiativa.

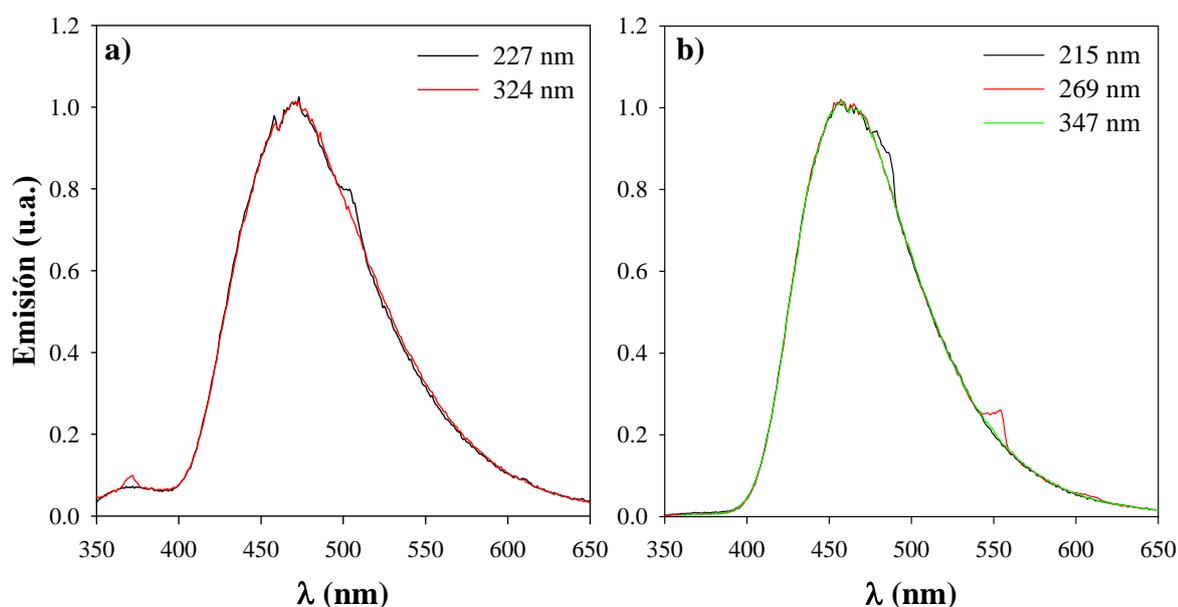


Figura 9.4: Espectros de emisión de Lum en soluciones ácidas (a), pH = 5,5) y alcalinas (b), pH = 10,5) por excitación con radiación de diferentes longitudes de onda.

9.2.2 Rendimiento cuántico de fluorescencia

Se determinaron los rendimientos cuánticos de emisión fluorescente (Φ_F). Como se describió en el Capítulo 7, dicha determinación se llevó a cabo mediante el empleo de los equipos I y III allí descritos. En las determinaciones se utilizaron dos referencias distintas: (i) 9,10 difenil antraceno (9,10-DPA) disuelto en ciclohexano, $\Phi_F = 0,95^1$, y (ii) bisulfato de quinina (BQ) en solución acuosa ácida (H_2SO_4 0,5 M), $\Phi_F = 0,546^{2,3}$. En estos

experimentos se registraron los espectros de emisión excitando en las correspondientes bandas de menor energía. Además se analizaron las soluciones en tres atmósferas diferentes: saturadas con N₂, equilibradas con aire y saturadas con O₂. Todos estos resultados se listan en la Tabla 9.1.

Los resultados muestran una diferencia significativa entre los Φ_F de la forma ácida y la forma alcalina, siendo este último valor bastante mayor. Estos resultados sugieren una fuerte dependencia con el pH de la emisión fluorescente de Lum. Asimismo, no se observan diferencias significativas entre los valores de Φ_F obtenidos en las distintas atmósferas (Tabla 9.1), indicando que el estado singlete excitado de Lum (¹Lum*) no es desactivado por el O₂.

Forma ácido-base de Lum	Referencia	λ_{exc} (nm)	Φ_F (N ₂ /Ar)	Φ_F (aire)	Φ_F (O ₂)
Ácida	BQ	325		0,094 ± 0,008	
	9,10-DPA	325	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,02
Alcalina	BQ	346		0,26 ± 0,01	
	9,10-DPA	350	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,02

Tabla 9.1: Rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de cada una de las forma ácido-base de Lum en las tres atmósferas: saturada con N₂/Ar, aire y O₂. $n_{H_2O} = 1,333$ y $n_{ciclohexano} = 1,426$.

9.2.3 Espectros de excitación

Se obtuvieron los espectros de excitación corregidos de las formas ácida y alcalina de Lum empleando la técnica descrita en el Capítulo 7. Estos experimentos se realizaron sobre soluciones equilibradas con aire, en condiciones de pH similares a las mencionadas en la sección anterior. En todos los casos, la emisión de las muestras se detectó a 460 nm. En la Figura 9.5 se observan los espectros de excitación corregidos, junto a los espectros de absorción. Con fines comparativos los espectros se normalizaron a la longitud de onda del máximo de la banda de menor energía. Se observa que los espectros de excitación y absorción coinciden, dentro del error experimental, en el rango de λ entre 250 y 400 nm (Figura 9.5). Cabe aclarar, que el ligero corrimiento entre los espectros a pH alcalino podría deberse, como se mencionó en el Capítulo 4, a las distintas especies tautoméricas presentes a ese pH.⁴

Tal como se detalló anteriormente, del análisis de los espectros de absorción y emisión puede desprenderse que en la Lumazina existen, al menos, dos estados excitados

singletes, S_1 de menor energía y S_2 , de mayor energía. Asimismo, dado que la intensidad relativa de las bandas del espectro de excitación coincide con las correspondientes bandas del espectro de absorción, puede deducirse que todas las moléculas excitadas a S_2 decaen al primer estado excitado S_1 (por conversión interna), a partir del cual la molécula sigue los procesos de desactivación propios de S_1 .

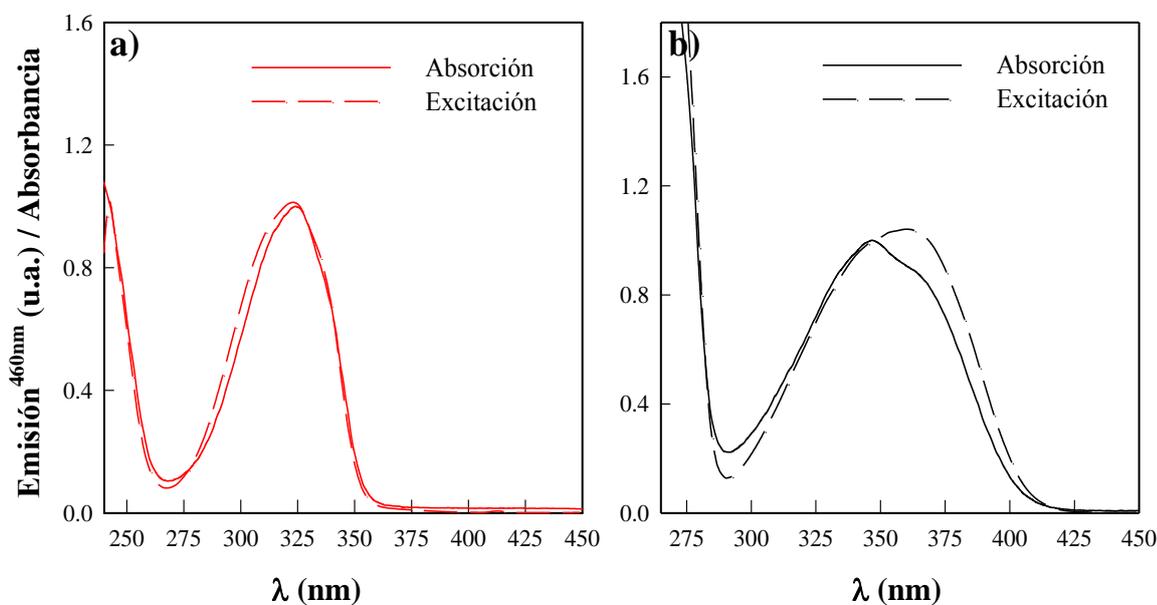


Figura 9.5: Espectros normalizados de excitación (- -) y absorción (—) de Lum. (a) Forma ácida (pH = 5,5). (b) Forma alcalina (pH = 10,5).

9.2.4 Tiempos de vida de fluorescencia

Con el objeto de determinar los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) para las formas ácida y alcalina del compuesto en estudio, se analizó la evolución de la intensidad de fluorescencia como una función del tiempo. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando el equipo I descrito en el Capítulo 7.

Este estudio se realizó sobre soluciones acuosas aireadas y se observó que los decaimientos de fluorescencia siguen un comportamiento exponencial de primer de orden. En la Figura 9.6, se muestra una traza típica registrada para Lum. El τ_F para cada forma ácido-base se obtuvo promediando al menos cinco valores. Los valores de τ_F obtenidos fueron $5,5 \pm 0,2$ ns para la forma ácida de Lum y $7,6 \pm 0,1$ ns para la forma alcalina.

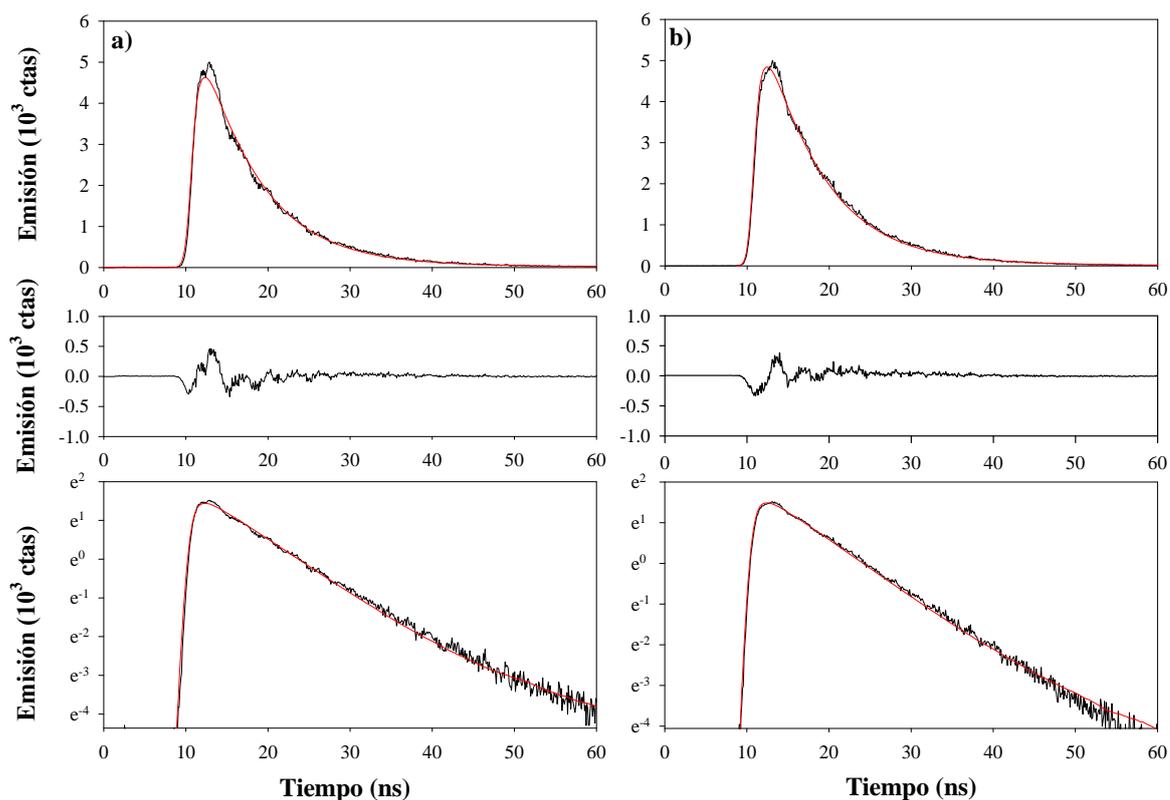


Figura 9.6. Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Traza experimental excitando a 340 nm y registrando la emisión a 450 nm, residuos y decaimiento en escala logarítmica. (a) pH 5,5. (b) pH 10,6. La línea roja representa el ajuste no lineal.

Los τ_F obtenidos corresponden a tiempos de vida de los estados excitados (S_1):

$$\tau_F = 1 / k_F \quad (1)$$

donde k_F corresponde a la suma de todas las constantes de velocidad de los distintos procesos que contribuyen al decaimiento del estado excitado. Por ejemplo, si consideramos que la fluorescencia del estado excitado S_1 compite con los procesos de conversión interna a S_0 (k_{IC}) y de entrecruzamiento de sistemas (k_{ISC}), la velocidad de decaimiento de la concentración S_1 vendrá dada por:

$$-d[S_1] / dt = k_F^0 [S_1] + k_{IC} [S_1] + k_{ISC} [S_1] = k_F [S_1] \quad (2)$$

donde k_F^0 es la constante de velocidad de fluorescencia intrínseca o natural. La constante k_F , obtenida experimentalmente, es: $k_F = \Sigma k_i$.

El rendimiento cuántico de fluorescencia viene dado por la siguiente ecuación:

$$\Phi_F = \frac{k_F^0}{\sum k_i} \tau_F \cdot k_F^0 \quad (3)$$

Esta expresión permite calcular, a partir de Φ_F y τ_F , los valores de k_F^0 para cada forma ácida-base de Lum. Los valores obtenidos fueron $0,018 \text{ ns}^{-1}$ y $0,034 \text{ ns}^{-1}$ para la forma ácida y alcalina, respectivamente.

9.3 Caracterización del estado excitado triplete de Lumazina

Con el objeto de caracterizar al estado excitado triplete de Lum ($^3\text{Lum}^*$) se realizaron experimentos de fotólisis de destello láser sobre soluciones acuosas en atmósfera de N_2 . Tal como se describió en el Capítulo 7, se usó como fuente de excitación el tercer armónico de un láser de Nd-YAG (355 nm). Estos experimentos se llevaron a cabo únicamente en soluciones alcalinas donde la forma aniónica de Lum está presente en solución.

Como se detalló en el Capítulo 7, no se pudieron realizar experimentos similares en medio ácido por lo que se decidió estudiar el $^3\text{Lum}^*$ por métodos indirectos a través de la formación de $^1\text{O}_2$ detectado por su emisión en el infrarrojo (NIR). Los experimentos se llevaron a cabo sobre soluciones aireadas, usando D_2O como solvente, e irradiando con longitud de onda de 309 nm.

9.3.1 Experimentos en medio alcalino

Al excitar con un pulso de láser de 355 nm una solución de Lum en atmósfera de N_2 y a pH 10,5 se observó la generación de especies transientes con absorción entre 400 y 600 nm cuyo decaimiento fue biexponencial, con tiempos de vida (τ) de $2,1 \pm 0,5 \mu\text{s}$ y $15 \pm 3 \mu\text{s}$ (Figura 9.7a).

En la Figura 9.7b se muestra el espectro de absorción del transiente de tiempo de vida más corto, obtenido según el procedimiento descrito en la Sección 7.2.4. Concretamente, el espectro se construyó a partir de los decaimientos registrados cada 10 nm en el rango de 405 – 600 nm. Se puede ver que el espectro presenta una banda de absorción entre 400 y 500 nm, con un máximo en 420 nm.

Los estados excitados tripletes se desactivan rápidamente al ponerlos en contacto con aire, debido a que el estado fundamental del O_2 es un triplete. Por lo tanto un

incremento en la velocidad de decaimiento del transiente al aumentar la concentración de O_2 evidencia que la señal de absorción observada, puede deberse a la absorción triplete-triplete (T-T). Por lo tanto se realizaron experimentos de fotólisis de destello láser en presencia de O_2 . En particular, se hicieron experiencias en 3 atmósferas distintas (N_2 , aire y O_2) a temperatura ambiente, que equivale a concentraciones de O_2 de 0, 0,28 y 1,33 mM. Los decaimientos observados se muestran en la Figura 9.8.

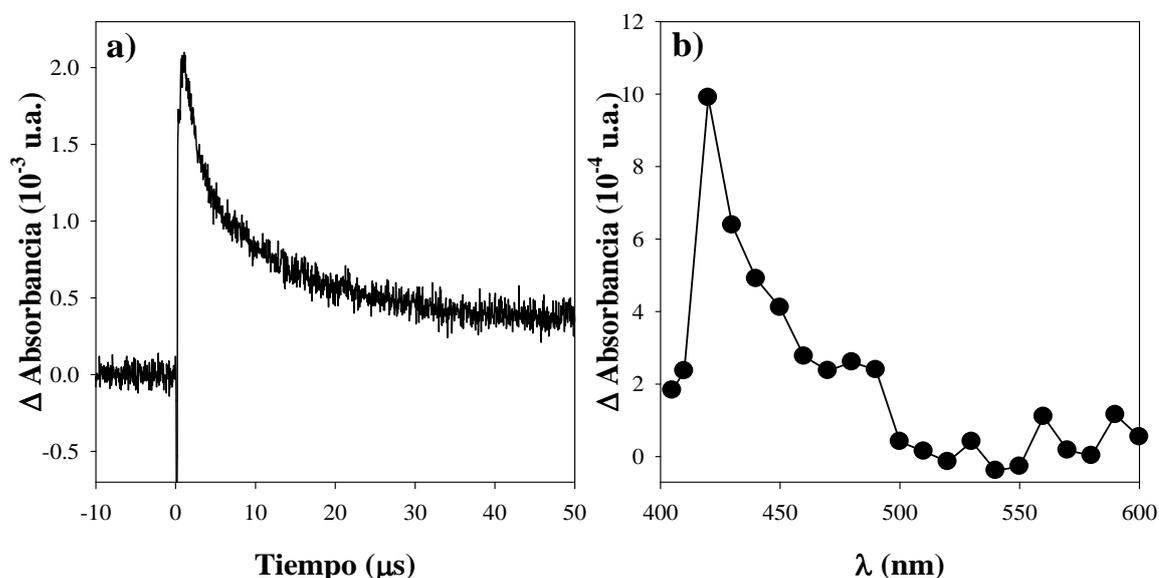


Figura 9.7: a) Variación de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo. pH = 10,5; $\lambda_{exc} = 355$ nm; $[Lum]_0$ 220 μ M; atmósfera saturada en N_2 . b) Espectro de absorción del transiente de menor tiempo de vida en H_2O a pH = 10,5 (Espectro obtenido a partir de los valores de intensidad extrapolada a tiempo cero, corregido por la transmitancia de los filtros, red de difracción y respuesta del PMT).

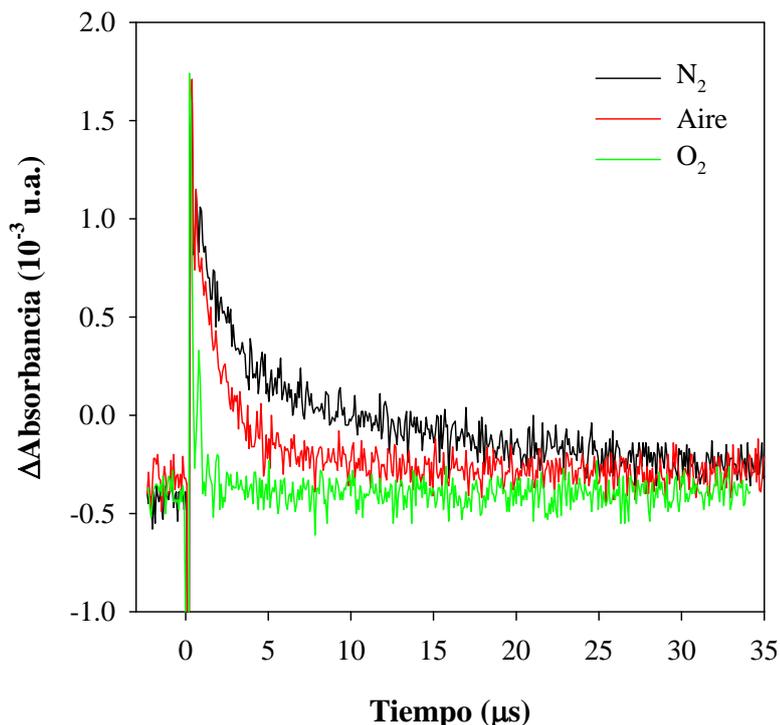


Figura 9.8: Variación de la absorbancia a 420 nm en función del tiempo. Traza experimental obtenida para una solución acuosa de Lum bajo diferentes concentraciones de O₂ (0, 0,28 y 1,33 mM). [Lum] = 220 μM; pH = 10,3; λ_{exc} = 355 nm.

De la figura se desprenden varios puntos importantes: (i) en todos los casos, el decaimiento sigue una cinética biexponencial, (ii) el tiempo de vida (τ) más corto es comparable con los ya reportados para los estados excitados triplete de otros compuestos pertenecientes a la familia de las pteridinas^{5,6} y (iii) claramente, la velocidad de decaimiento de dicho transiente se incrementa conforme aumenta la concentración de O₂. En base a los resultados hasta aquí presentados se puede afirmar que el transiente de tiempo de vida más corto se trata del estado triplete excitado de Lum (³Lum*) y a su tiempo de vida de aquí en adelante lo llamaremos τ_T .

Con el objeto de caracterizar y cuantificar el proceso de desactivación del estado ³Lum* por O₂, se realizaron experiencias para determinar el valor de τ_T a medida que se aumenta la concentración de O₂ en la solución. Se logró tener varias concentraciones de O₂, gracias a la utilización del dispositivo ya descrito en el Capítulo 7, que permite modificar la relación entre N₂ y O₂ de manera de ajustar la concentración deseada. Graficando $1/\tau_T$ en función de la concentración de O₂, se obtiene una recta, de cuya

pendiente se calcula la constante de desactivación del ${}^3\text{Lum}^*$ por O_2 (Figura 9.9). El valor obtenido fue $(1,2 \pm 0,1) 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Asimismo se evaluó si el ${}^3\text{Lum}^*$ es sensible a la concentración de Lum. Para ello se registraron los decaimientos del triplete en soluciones acuosas saturadas en N_2 , de concentraciones crecientes de Lum. En el rango de concentraciones comprendido entre 75 y 310 μM no se observó una desactivación significativa del ${}^3\text{Lum}^*$; por lo que se puede asegurar que la desactivación observada con la concentración de O_2 es debida a éste y no a Lum en sí misma.

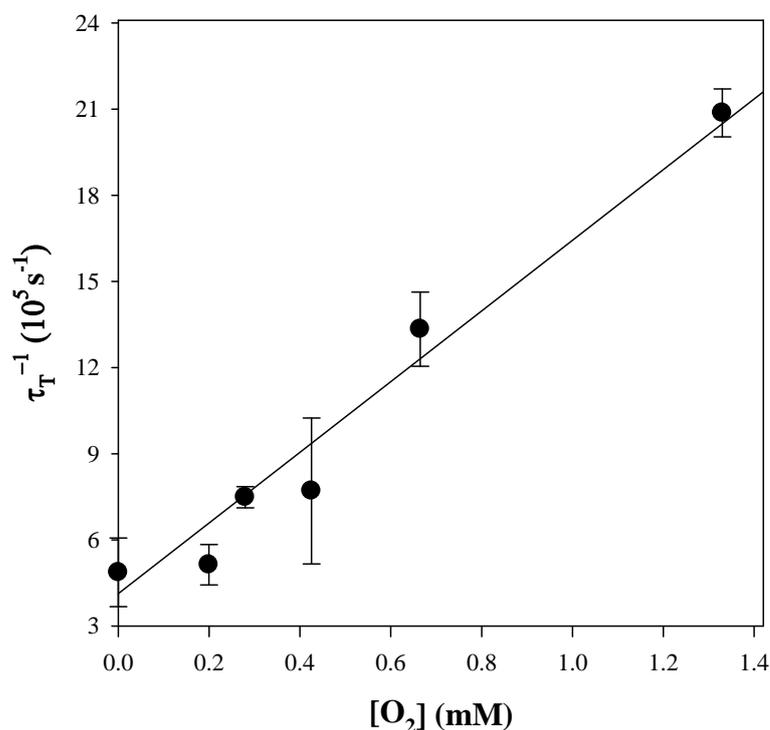


Figura 9.9: Desactivación de ${}^3\text{Lum}^*$ por O_2 . Gráfica de Stern-Volmer: variación de la inversa de los tiempos de vida del ${}^3\text{Lum}^*$ (τ_T^{-1}) con la concentración de O_2 . $[\text{O}_2] = 0; 0,2; 0,28; 0,43; 0,67; 1,33 \text{ mM}$. $[\text{Lum}] = 220 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 10,3$; $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$.

9.3.2 Experimentos en medio ácido

Para la determinación y caracterización del ${}^3\text{Lum}^*$ en medio ácido, se realizaron experimentos de ${}^1\text{O}_2$ mediante el empleo de un detector de Ge (Capítulo 7). Los mismos se realizaron sobre soluciones acuosas aireadas usando D_2O como solvente.⁷ Tal como se detalló en el Capítulo 7, al excitar la muestra se observa una señal que aumenta hasta un valor máximo desde el cual posteriormente decae hasta alcanzar la línea de base inicial (Figura 9.10).

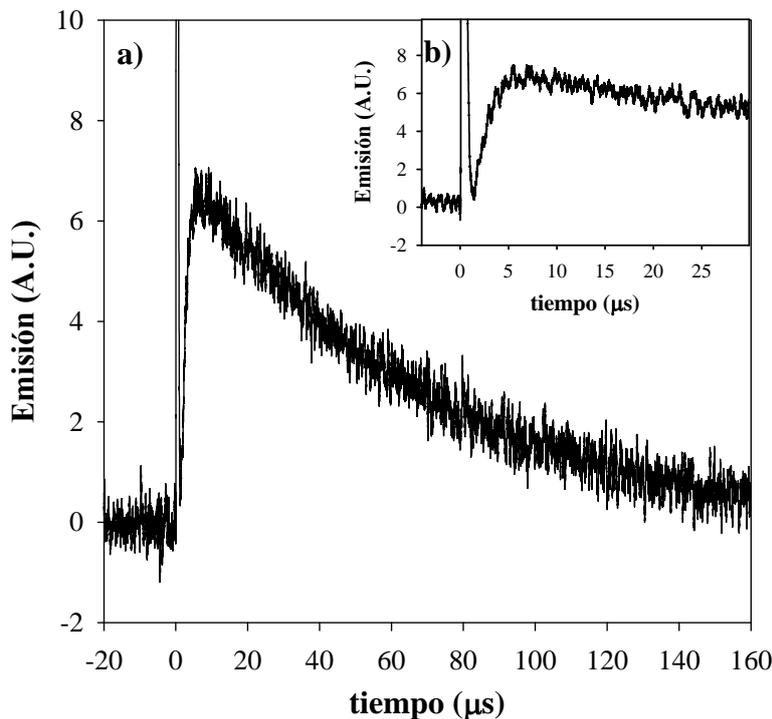


Figura 9.10: Variación de la emisión a 1270 nm en función del tiempo. Traza experimental obtenida para una solución de Lum en D₂O 80 μM en atmósfera aireada. pD = 5,5; λ_{exc} = 309 nm. (a) Señal tomada en la escala 20 μs / división. (b) Señal tomada en la escala 4 μs / división.

Considerando que la emisión a 1270 nm observada, corresponde al ¹O₂ formado como consecuencia de una transferencia de energía entre ³Lum* y el O₂; la porción ascendente de la señal corresponde al decaimiento del ³Lum*, y la parte descendente de la de la misma da cuenta de la desactivación del ¹O₂. El comportamiento biexponencial de las señales fue ajustado mediante la siguiente ecuación:

$$I = A_1 e^{-t/\tau_\Delta} - A_2 e^{-t/\tau_T} \quad (4)$$

donde I es la señal registrada por el detector de NIR, que es proporcional a la concentración de ¹O₂. A_1 y A_2 son los factores pre-exponencial, τ_Δ y τ_T son los tiempos de vida del ¹O₂ y el ³Lum*, respectivamente. Por tanto, como resultado de analizar ambas porciones de la señal se puede estimar τ_T y τ_Δ . Los valores hallados para ambos tiempos de vida fueron, $1,6 \pm 0,3 \mu\text{s}$ y $63 \pm 2 \mu\text{s}$, respectivamente. Vale aclarar que en estos

experimentos τ_T corresponde al tiempo de vida del triplete en aire. En ese sentido este valor no puede compararse directamente con el obtenido para la forma alcalina (Sección 9.3.1).

Con el objeto de caracterizar al $^3\text{Lum}^*$ en medio ácido, se realizaron experimentos similares a los recientemente descritos, pero variando la concentración de O_2 . Las distintas señales se registraron en diferentes escalas de tiempo, con el objeto de determinar los parámetros τ_Δ y τ_T . Empleando ventanas de tiempo mayores a 100 μs se calculó τ_Δ para cada concentración de O_2 , mediante análisis monoexponencial ($I = A_1 e^{-t/\tau_\Delta}$). A continuación, estos valores fueron introducidos en la ecuación 4 y se calculó τ_T para cada concentración de O_2 . Este análisis se hizo sobre las señales tomadas en ventanas de tiempo corto de $\sim 50 \mu\text{s}$. Los valores de τ_T obtenidos, se graficaron en función de la concentración de O_2 y, mediante un análisis Stern-Volmer con la ecuación 5, se obtuvo de la pendiente de la recta el valor de la constante bimolecular de desactivación por O_2 ($k_q^{\text{O}_2}$) (7 ± 1) $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 9.11).

$$\tau_T^0/\tau_T = 1 + k_q^{\text{O}_2} \tau_T^0 [\text{O}_2] \quad (5)$$

En ausencia de desactivador (O_2), el valor de τ_T (τ_T^0) no puede ser calculado directamente, ya que necesariamente los experimentos debieron realizarse en presencia de O_2 , por lo que fue estimado de la ordenada al origen de la ecuación de Stern Volmer y el valor encontrado fue $2,6 \pm 0,5 \mu\text{s}$, el cual resultó ser del mismo orden de magnitud al obtenido para medio alcalino en ausencia de O_2 (Sección 9.3.1).

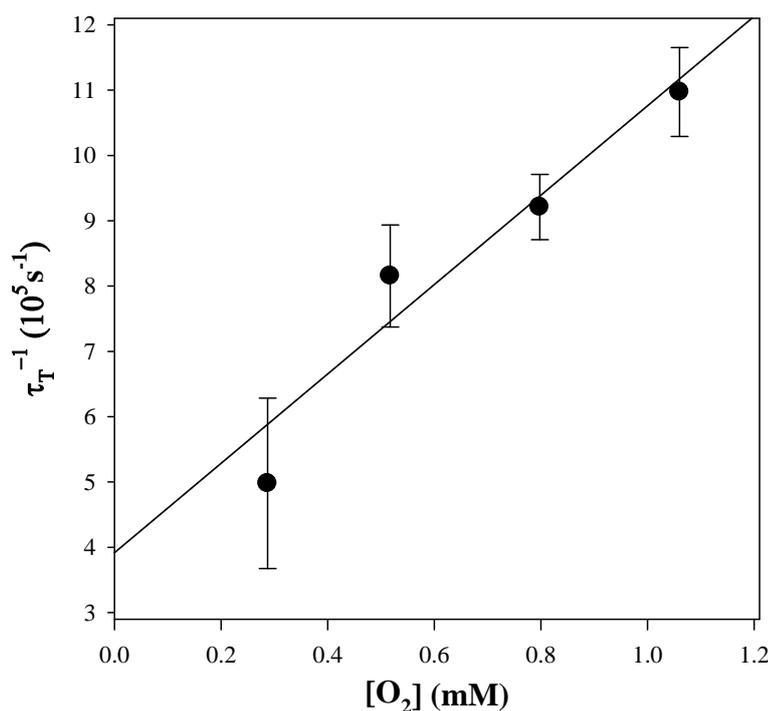


Figura 9.11: Desactivación de $^3\text{Lum}^*$ por O_2 . Gráfica de Stern-Volmer: variación de la inversa de los tiempos de vida de $^3\text{Lum}^*$ (τ_t^{-1}) con la concentración de O_2 . [O_2] = 0,28; 0,52; 0,79; 1,06 mM. [Lum] = 80 μM ; pD = 5,5; λ_{exc} = 309 nm.

9.4 Desactivación de los estados excitados singlete y triplete de Lumazina por yoduro

El anión yoduro, por su naturaleza química, puede participar en procesos de oxidoreducción, desactivando fácilmente los estados excitados (tanto singlete como triplete) de diferentes sensibilizadores. Esta característica suele ser aprovechada para entender mecanismos de reacciones fotoquímicas. Fundamentalmente, para dilucidar cuál es la multiplicidad de espín de los estados excitados de un determinado compuesto que participan en una reacción fotoquímica dada. Concretamente, como se describió en el Capítulo 7, se realizaron experimentos de desactivación de ambos estados excitados de Lum, con el objeto de dilucidar bajo qué condiciones el anión yoduro (I^-) es capaz de desactivarlos.

Para entender más acerca de estos mecanismos de desactivación, en una primera etapa se estudió el efecto del anión yoduro sobre la fluorescencia de Lum. Las medidas se llevaron a cabo en condiciones estacionarias, usando el equipo II (Capítulo 7). Los experimentos se realizaron empleando soluciones ácidas y alcalinas de Lum de concentración constante (75 μM) y se fue variando la concentración de I^- , en un intervalo

de concentraciones comprendido entre 0 y 34 mM. En ambas condiciones de pH se observó que los espectros de emisión de Lum presentan, en el intervalo de concentraciones ensayadas, una pequeña disminución progresiva en intensidad al aumentar la concentración de Γ ; manteniéndose inalterada la posición de los máximos de los mismos. En la Figura 9.12 se presentan los resultados del estudio de la dependencia de la intensidad de fluorescencia (I), con la concentración de Γ . Se puede observar que para ambas condiciones de pH, existe una pequeña disminución de I_F con el incremento en la concentración; lo cual se ve reflejado por un aumento en la pendiente de la gráfica I^0/I en función de la concentración de Γ . Estos resultados muestran que para que exista el efecto de desactivación de $^1\text{Lum}^*$ por Γ , la concentración requerida debe ser superior a 2 mM.

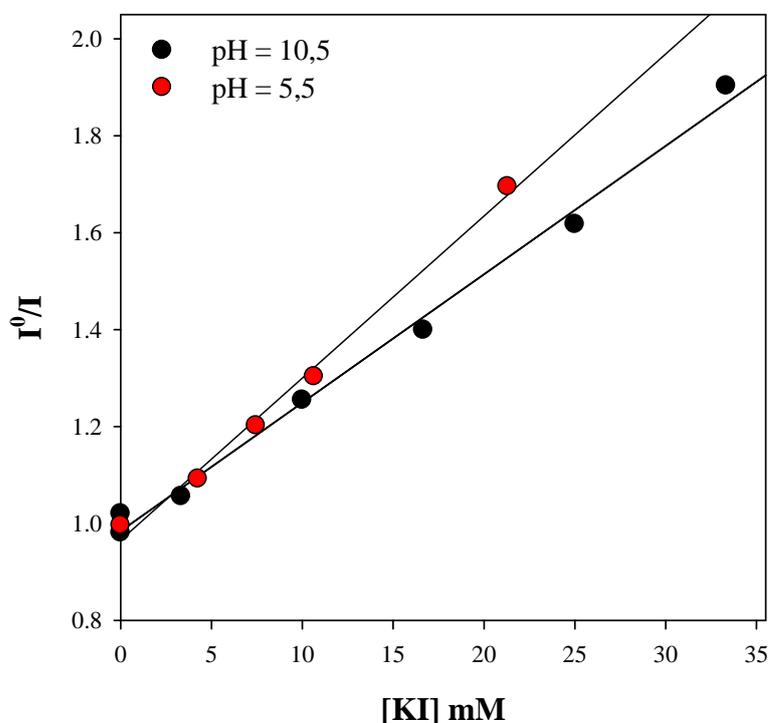


Figura 9.12: Desactivación de la fluorescencia de Lum por yoduro. Gráficas de Stern-Volmer. $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$. (●) pH = 5,5. (●) pH = 10,5.

Teniendo en cuenta bajo qué concentraciones de Γ se ve afectado el estado excitado singlete de Lum, se realizaron experimentos con concentraciones de Γ inferiores a 2 mM, para comprobar si el estado excitado triplete de Lum se ve afectado o no por dicho anión. Para ello se realizaron experimentos similares a los descritos en las Secciones 9.3.1 y 9.3.2 para medio alcalino y ácido, respectivamente; pero usando Γ en lugar de O_2 como desactivador. Se usaron concentraciones en el intervalo comprendido entre 0 y 400 μM y

se hicieron gráficos de Stern-Volmer para evaluar, en caso de que exista, la magnitud de la desactivación (Figura 9.13).

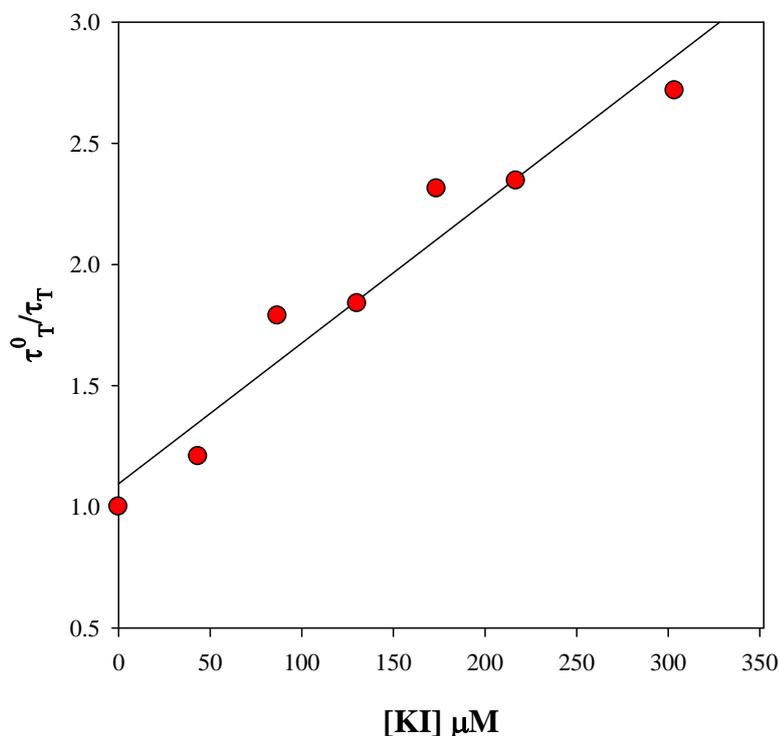


Figura 9.13: Desactivación de $^3\text{Lum}^*$ por I^- . Gráfica de Stern-Volmer: variación de los tiempos de vida de $^3\text{Lum}^*$ (τ_T) con la concentración de yoduro. $[\text{Lum}] = 80 \mu\text{M}$. (●) $\text{pD} = 5,5$. $\lambda_{\text{exc}} = 309 \text{ nm}$.

En base al análisis Stern-Volmer realizado con la ecuación 5 (usando yoduro como desactivador) se obtuvo, de la pendiente de la recta, el valor de la constante bimolecular de desactivación por I^- para medio ácido ($k_q^{\text{I}^-} = (3,2 \pm 0,5) 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). El análisis en medio alcalino no mostró cambios en el τ_T de Lum con la concentración de I^- .

De los resultados aquí presentados, se puede concluir, que el triplete de Lum sólo es desactivado por el anión I^- en medio ácido, dado que en medio alcalino la transferencia de electrones se encuentra desfavorecida debido a la carga negativa de la molécula de Lum. Estos experimentos resultan de utilidad para casos en los que se quiera discriminar cual es la especie excitada interviniente en una determinada reacción, ya que variando los rangos de concentraciones de KI utilizadas en los experimentos, podemos desactivar selectivamente al $^1\text{Lum}^*$ o al $^3\text{Lum}^*$.

9.5 Referencias

- 1 M. Mardelli, J. Olmsted III, *J. Photochem.* **1977**, 7, 277–285
- 2 D. F. Eaton, “*Handbook of organic photochemistry*”, ed. J. C. Scaiano, CRC Press, Boca Raton, Florida, **1989**, capítulo 8. Eaton (**1989**)
- 3 S. R. Meech, D. Phillips, *J. Photochem.*, **1993**, 23, 193–217
- 4 R. Klein, I. Tatischeff, *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 45, 55-65
- 5 C. Chahidi, M. Aubailly, A. Momzikoff, M. Bazin, R. Santus, *Photochem. Photobiol.*, **1981**, 33, 641-649
- 6 J. W. Ledbetter, W. Pfeleiderer, J. H. Freisheim, *Photochem. Photobiol.*, **1995**, 62, 71-81
- 7 P. R. Ogilby, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 3423–3430

Capítulo 10

Fotoquímica de Lumazina y generación de especies reactivas de oxígeno

En este capítulo se presenta el comportamiento de Lumazina (Lum) al exponerse a radiación UV. Se muestran los resultados de la fotólisis de ambas formas ácido-base en distintas atmósferas. Debido a que este compuesto no posee sustituyentes, el estudio de la fotólisis del mismo, representa el estudio de la reactividad fotoquímica del doble anillo pterídínico propiamente dicho. Se presentan los valores de los rendimientos cuánticos de consumo de Lum (Φ_{Lum}) y se analiza la participación del O_2 en los mecanismos fotoquímicos.

Especial atención se prestó a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). En particular, se investigó la formación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), durante la irradiación de soluciones acuosas de Lum con radiación UV. Se calcularon los rendimientos cuánticos de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_{Δ}) y los valores de las constantes de velocidad de desactivación total de $^1\text{O}_2$ por Lum (k_t^{Lum}). El estudio presentado en este capítulo aporta información que será útil para dilucidar los mecanismos de reacción involucrados en reacciones fotosensibilizadas.

10.1 Irradiación en ausencia de oxígeno

Para estudiar la estabilidad fotoquímica de Lum en ausencia de O_2 , se irradiaron soluciones ácidas y alcalinas previamente burbujeadas con Ar, con radiación UV de 350 nm. En la Figura 10.1 se muestran los resultados del análisis espectrofotométrico. Tanto en medio ácido como en medio alcalino se observaron ligeros cambios en los espectros de absorción de las soluciones irradiadas hasta 240 minutos.

Las soluciones irradiadas en ausencia de O_2 se analizaron por HPLC. En la Figura 10.2 se muestra la evolución de la concentración de Lum en función del tiempo de irradiación en ambas condiciones de pH. Este consumo, aunque pequeño, marca una diferencia notable con lo observado para la fotoquímica de pterina (Ptr), la cual es completamente estable en condiciones anaeróbicas.¹ Bajo las condiciones experimentales de trabajo se obtuvieron velocidades de degradación de $0,09 \pm 0,04 \mu\text{M}/\text{min}$ y $0,15 \pm 0,04 \mu\text{M}/\text{min}$ para medio ácido y alcalino, respectivamente. En base a las velocidades obtenidas, se calcularon los rendimientos cuánticos de consumo de Lum (Φ_{Lum}) (Sección 5.5) arrojando valores de $(3,0 \pm 0,7) 10^{-4}$ y $(3,5 \pm 0,6) 10^{-4}$ para medio ácido y alcalino,

respectivamente. Los errores en los valores de Φ_{Lum} son relativamente grandes, debido al escaso consumo de reactivo observado.

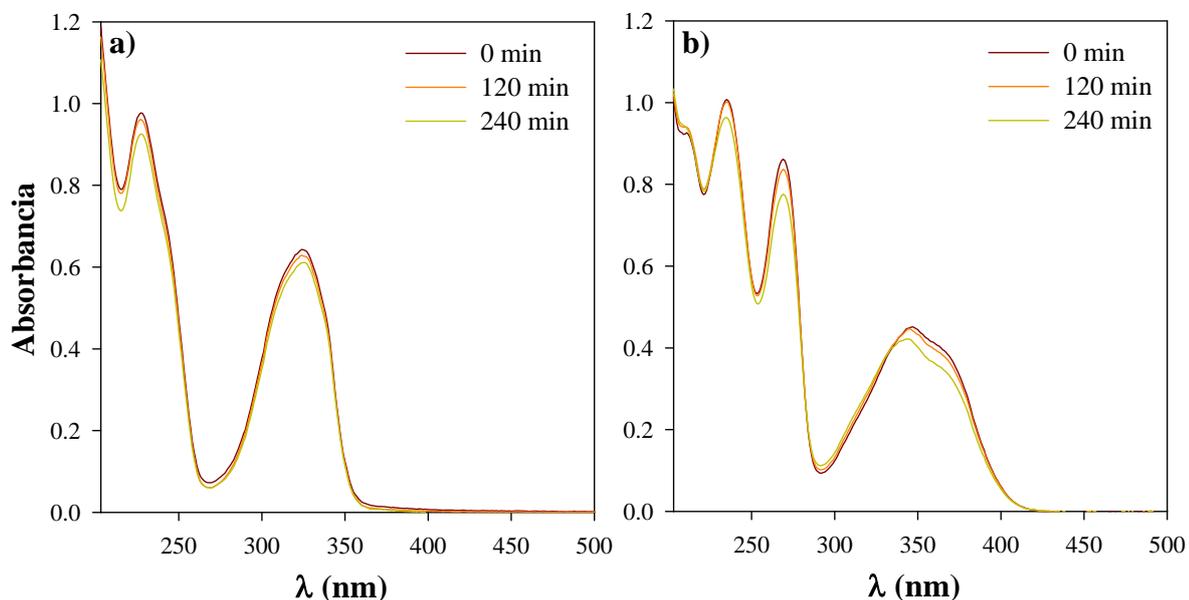


Figura 10.1: Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas de Lum en ausencia de O_2 . a) $\text{pH} = 5,5$; $[\text{Lum}]_0 = 470 \mu\text{M}$. b) $\text{pH} = 10,5$; $[\text{Lum}]_0 = 410 \mu\text{M}$; $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$; Camino óptico: = $0,4 \text{ cm}$.

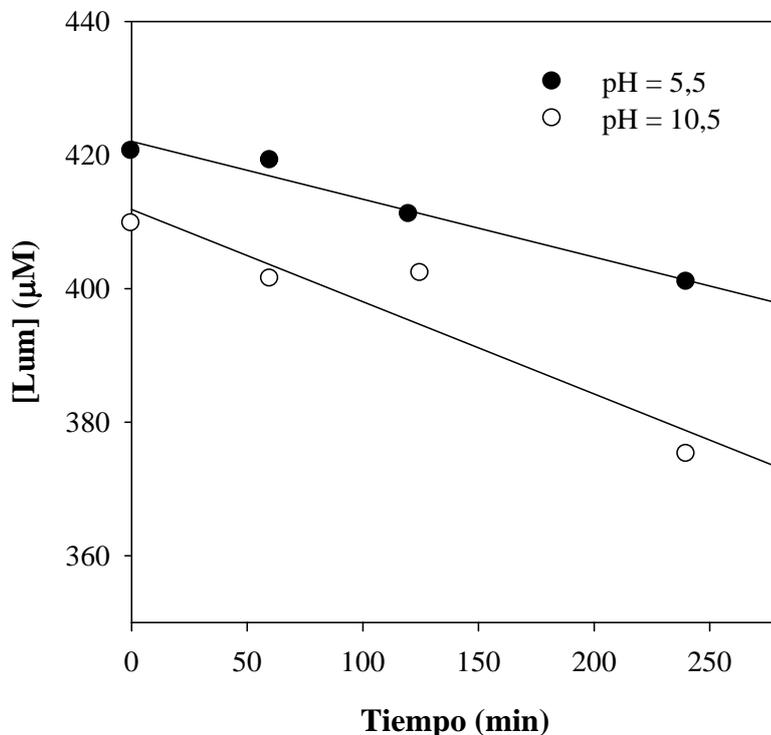


Figura 10.2: Evolución de la concentración de Lum en función del tiempo de irradiación. Atmósfera de Ar. Forma ácida $[\text{Lum}]_0 = 420 \mu\text{M}$. Forma alcalina $[\text{Lum}]_0 = 410 \mu\text{M}$.

En la Figura 10.3 se muestra un cromatograma correspondiente a una solución de Lum no irradiada, junto con otro obtenido para una solución irradiada 240 minutos a pH ácido. En este último se observa la presencia de varios fotoproductos. Los productos de tiempo de retención (t_r) mayor que Lum presentan espectros compatibles con el anillo pteridínico, mientras que puede suponerse que los de t_r menores han perdido dicha estructura.

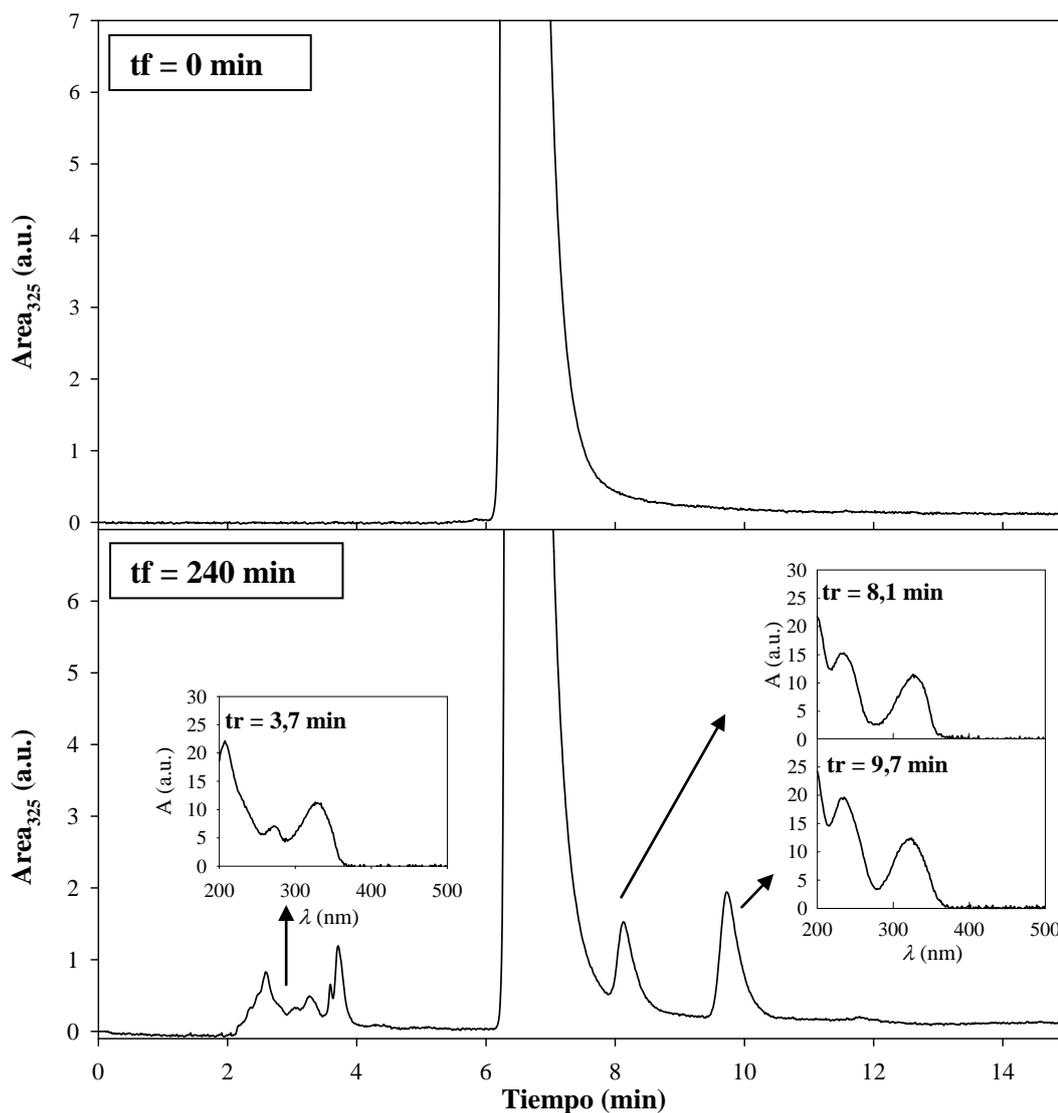


Figura 10.3: Cromatogramas de soluciones de Lum burbujeadas con Ar. (a) solución no irradiada y (b) solución irradiada durante 240 minutos en ausencia de O_2 . $[Lum]_0 = 400 \mu M$; $pH = 5,5$. ($\lambda_{an} = 325 \text{ nm}$). Inserto: espectros de absorción de los productos encontrados. Equipo: HPLC-1. Fase móvil: sistema I.

10.2 Irradiación en presencia de oxígeno

Al irradiar soluciones acuosas aireadas de Lum a pH 5,5 y 10,5 se observan sólo pequeños cambios en los espectros de absorción, incluso luego de 240 minutos. De estos resultados se deduce que, la presencia de O₂ no aumenta significativamente el consumo de Lum, respecto a los experimentos realizados en condiciones anaeróbicas.

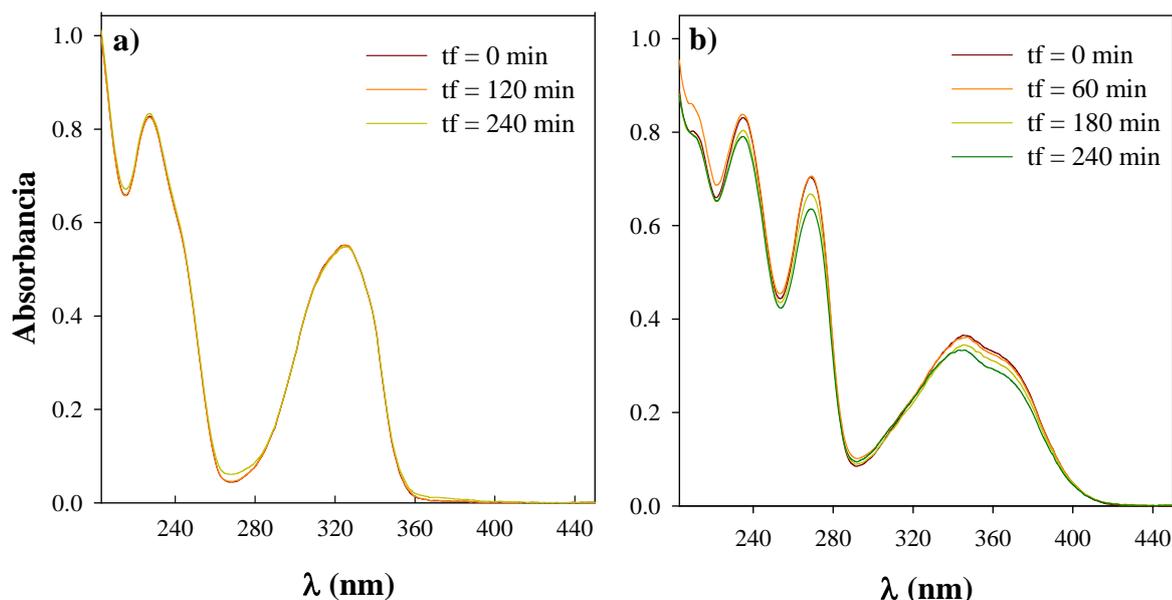


Figura 10.4: Evolución de los espectros de absorción de soluciones aireadas de Lum ($[Lum]_0 = 370 \mu M$) con el tiempo de irradiación. (a) pH = 5,5 y (b) pH = 10,5.

La variación en la concentración de Lum con el tiempo de irradiación fue cuantificada por HPLC. Bajo las condiciones experimentales de trabajo la velocidad de degradación de Lum fue de $0,07 \pm 0,02$ y $0,13 \pm 0,02 \mu M/min$ para medio ácido y alcalino, respectivamente. Con estas velocidades de consumo, se calcularon los rendimientos cuánticos de degradación (Φ_{Lum}) y los valores obtenidos fueron $(2 \pm 1) 10^{-4}$ y $(2,7 \pm 0,7) 10^{-4}$, respectivamente. Nuevamente los errores son altos debido a la pequeña variación medida en la concentración de Lum. Teniendo en cuenta dichos errores, los rendimientos cuánticos obtenidos en presencia o ausencia de O₂ son equivalentes. Por otro lado, estos valores de rendimiento cuánticos son menores que los valores previamente obtenidos para Ptr¹ indicando que Lum es aún más fotoestable al ser irradiado con luz UV.

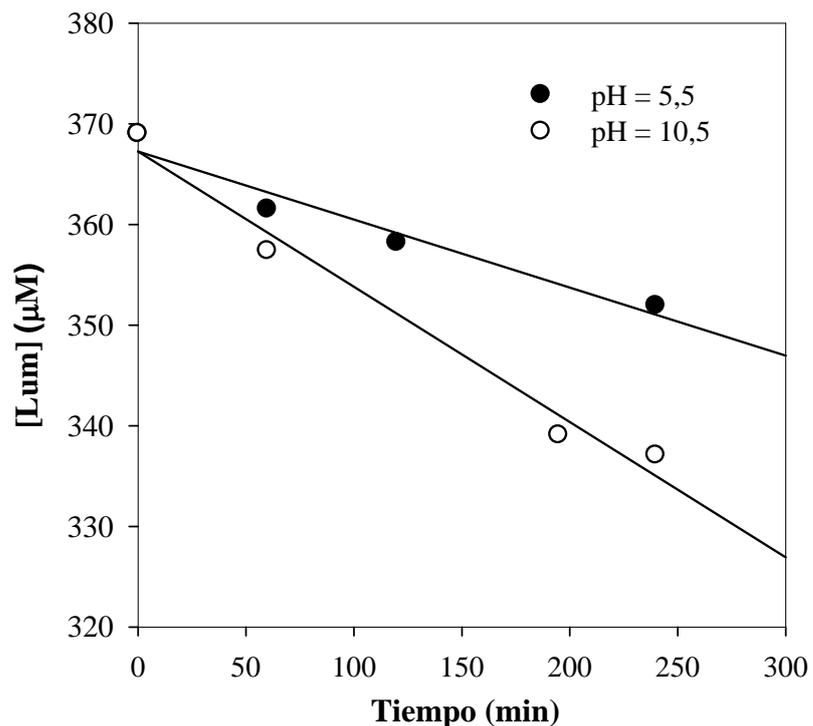


Figura 10.5: Evolución de la concentración de Lum con el tiempo de irradiación. Fotólisis en presencia de O₂. [Lum]₀ = 370 μM.

En el análisis de los cromatogramas obtenidos por HPLC se puede observar que, al menos a pH ácido, se obtienen numerosos productos, todos con t_r menores que el de Lum. Debido a la superposición de picos y a la muy baja concentración de dichos productos, las áreas correspondientes a 325 nm son muy pequeñas comparadas con el área de Lum y es muy difícil obtener espectros de absorción adecuados. No obstante, el espectro de absorción obtenido para un t_r de 4,1 min no se corresponde con una estructura pteridínica, indicando que el anillo pteridínico se rompe (Figura 10.6), al menos para algún producto.

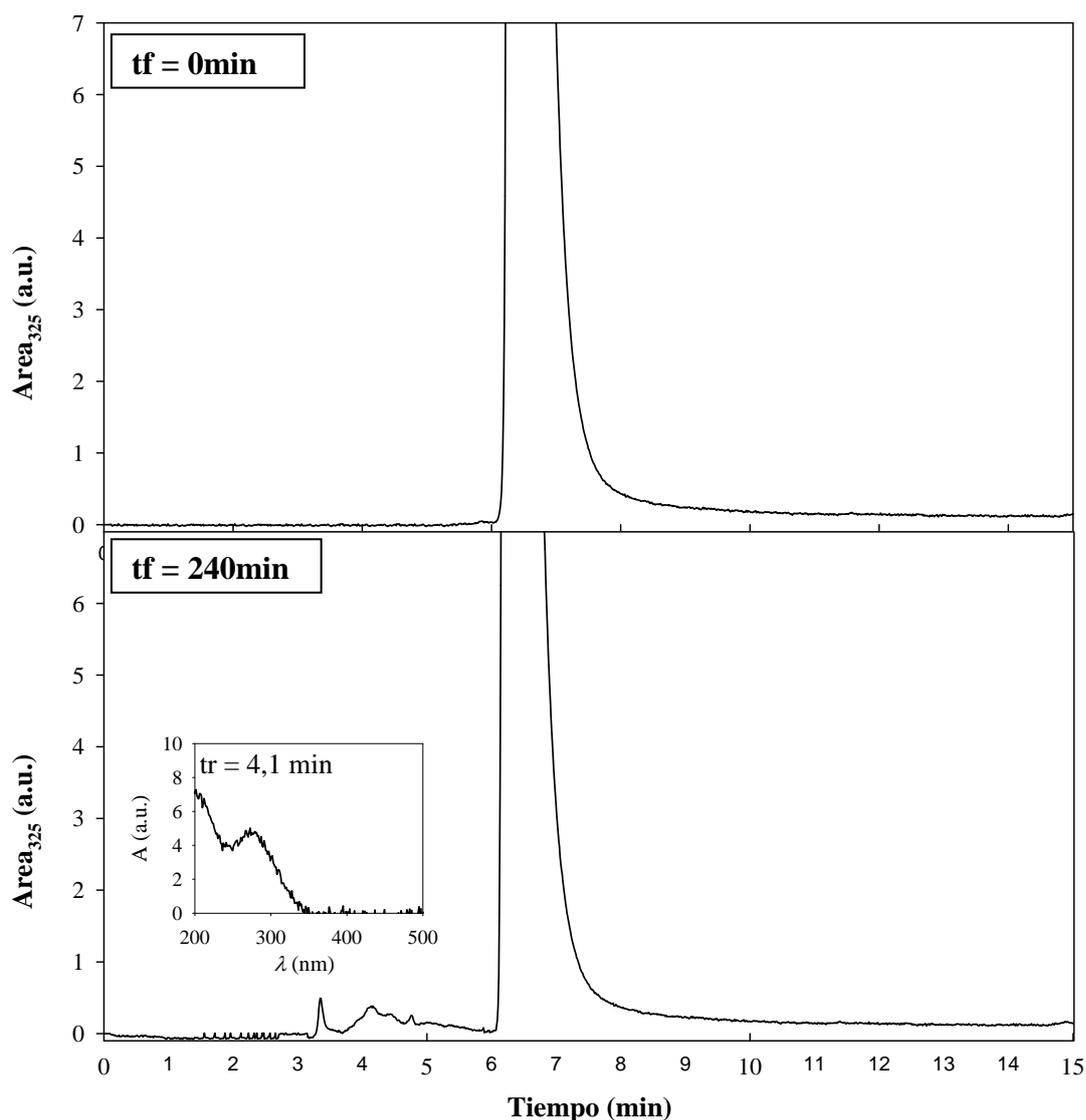


Figura 10.6: Cromatogramas de soluciones de Lum en aire. (a) no irradiadas y (b) irradiadas durante 240 minutos en presencia de O_2 . $[Lum]_0 = 400 \mu M$; $pH = 5,5$. ($\lambda_{\text{análisis}} = 325 \text{ nm}$). Inserto: espectro de absorción registrado para $t_r = 4,1 \text{ min}$.

Asimismo, se detectó la presencia de H_2O_2 en soluciones irradiadas de Lum en presencia de O_2 , mediante el empleo del método enzimático colorimétrico descrito en el Capítulo 6. La Figura 10.7 muestra la evolución de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación de una solución de Lum ($370 \mu M$), en ambas condiciones de pH . Estos experimentos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones experimentales que las usadas para la determinación del rendimiento cuántico de consumo de Lum. Los valores de velocidad de producción de H_2O_2 , durante los primeros 240 minutos de irradiación, para ambas condiciones fueron $0,013 \pm 0,005 \mu M/\text{min}$ y $0,09 \pm 0,01 \mu M/\text{min}$. Estas velocidades

conducen a valores de rendimientos cuánticos de formación de H_2O_2 ($\Phi_{\text{H}_2\text{O}_2}$) de $(3,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$ y $(1,9 \pm 0,9) \cdot 10^{-4}$ para medio ácido y alcalino, respectivamente. Estos valores son del orden de los valores de (Φ_{Lum}) calculados bajo las mismas condiciones experimentales.

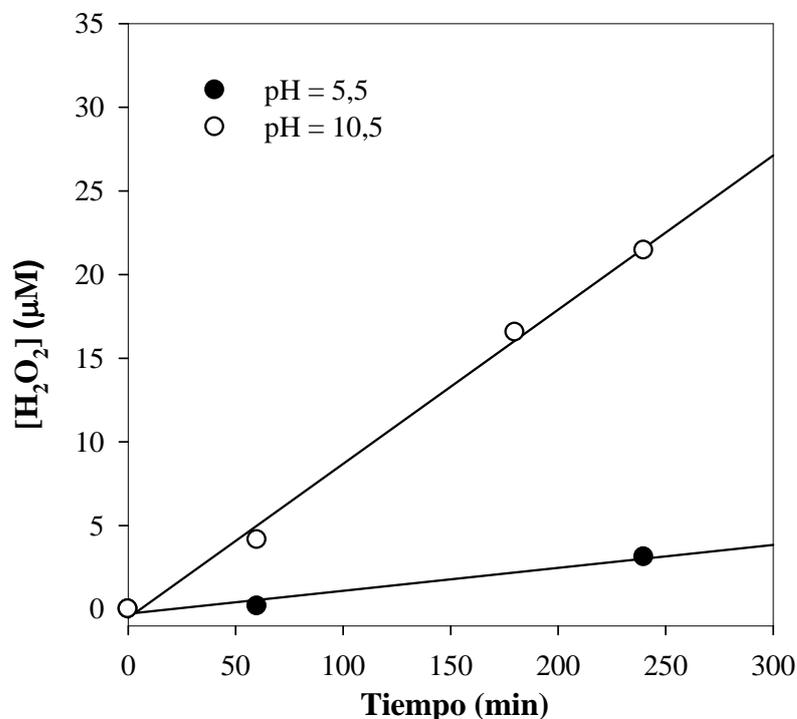


Figura 10.7: Evolución de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación de una solución de Lum $370 \mu\text{M}$.

A continuación se resumen los valores de rendimientos cuánticos obtenidos en estas secciones.

	Forma ácida	Forma alcalina
$\Phi_{\text{Lum}}^{\text{Aire}}$	$(2,0 \pm 1,0) \cdot 10^{-4}$	$(2,7 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$
$\Phi_{\text{Lum}}^{\text{Ar}}$	$(3,0 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$	$(3,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$
$\Phi_{\text{H}_2\text{O}_2}$	$(3,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-5}$	$(1,9 \pm 0,9) \cdot 10^{-4}$

Tabla 10.1: Valores de rendimientos cuánticos de consumo de Lum y producción de H_2O_2 . $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$. $q^{0,v}_{p,\lambda} = (7,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-6} \text{ E s}^{-1}$.

10.3 Oxígeno singlete

En esta sección se analizará la producción fotoquímica de $^1\text{O}_2$, y la desactivación de dicha especie por Lum.

10.3.1 Desactivación total de oxígeno singlete por Lumazina

La determinación de la constante de desactivación total del $^1\text{O}_2$ (k_t^{Lum}) por un compuesto orgánico determinado (Sección 7.3.4) resulta una herramienta muy útil para evaluar la interacción entre ambas especies químicas y la eficiencia de dicho compuesto para desactivar $^1\text{O}_2$, lo cual está relacionado con su capacidad antioxidante. En este marco, se realizó un estudio cinético sobre los procesos de desactivación de $^1\text{O}_2$ por cada forma ácido-base de Lum.

Para la determinación de los valores de k_t^{Lum} para las formas ácida y alcalina de Lum se realizaron ensayos sobre soluciones aireadas preparadas en D_2O , a $\text{pD} = 5,5$ y $10,5$ respectivamente, según la metodología detallada en el Capítulo 5. Para estos ensayos se usó ácido perinaftenona-2-sulfónico (PNS) como sensibilizador de $^1\text{O}_2$ y se irradiaron las soluciones con λ de 416 nm. Se seleccionó esta λ_{exc} ya que en esta zona del espectro electromagnético el PNS presenta buena absorción, mientras que ninguna de las formas ácido-base de Lum es capaz de absorber la radiación incidente. Se realizaron gráficas tipo Stern-Volmer, del tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ (τ_Δ) a medida que aumenta la concentración de Lum (ecuación 29, Capítulo 7). Estas gráficas presentan una correlación lineal en el intervalo de concentraciones de trabajo (Figura 10.8). Los valores de k_t^{Lum} obtenidos de las pendientes de estos gráficos fueron $(27 \pm 2) \cdot 10^5$ y $(8,9 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH ácido y alcalino, respectivamente. A partir de estos valores se pueden hacer los siguientes comentarios: (i) si bien ambas formas ácido-base de Lum presentan valores relativamente bajos de k_t^{Lum} , se puede apreciar que la forma ácida presenta un valor que es entre 3 y 4 veces superior al observado para la forma alcalina; (ii) es interesante aclarar que, en el caso de los ensayos realizados en medio alcalino, el valor de k_t^{Lum} es perfectamente comparable con el valor obtenido mediante experimentos en estado estacionario anteriormente publicado ($(7,2 \pm 0,7) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$); (iii) los valores de k_t^{Lum} obtenidos son del mismo orden de magnitud que otros valores de k_t previamente determinados para otros compuestos heterocíclicos relacionados como algunas pterinas aromáticas.^{3,4}

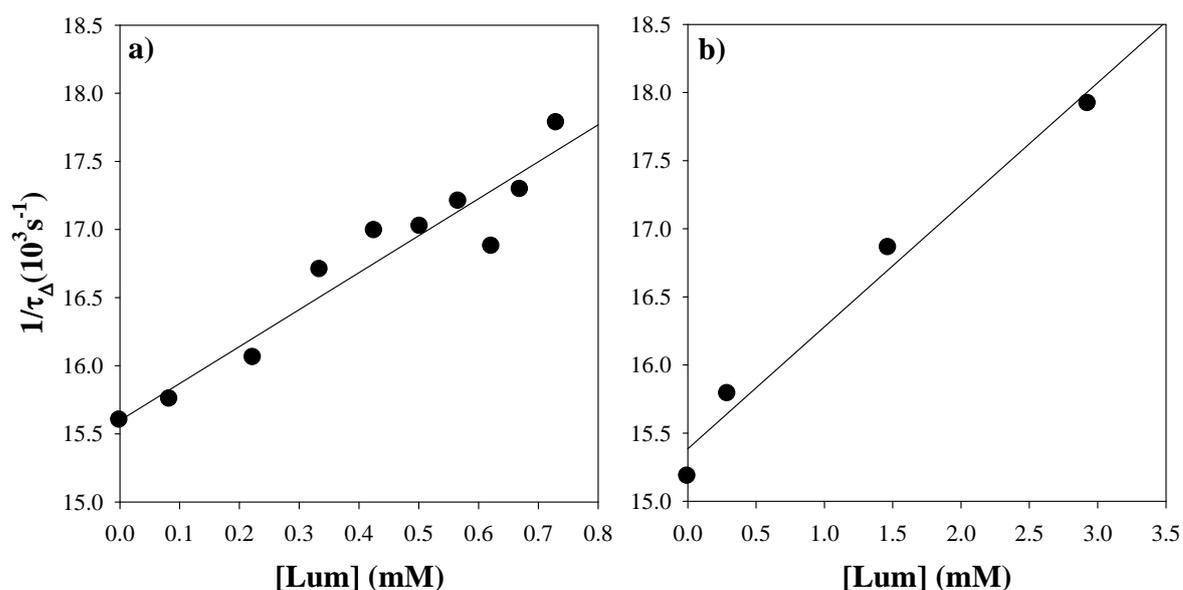


Figura 10.8: Desactivación de $^1\text{O}_2$ por Lum. Variación del tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ (τ_{Δ}) con la concentración de Lum en D_2O (sensibilizador: PNS, $\lambda_{\text{exc}} = 416 \text{ nm}$). a) pD = 5,5. b) pD = 10,5.

10.3.2 Rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete por Lumazina

Estos estudios se llevaron a cabo mediante técnicas resueltas en el tiempo. Como se evidenciará a continuación, los resultados obtenidos son perfectamente compatibles con los obtenidos previamente mediante técnicas de estado estacionario.²

Se prepararon soluciones de Lum en D_2O equilibradas con aire y O_2 a las cuales se les monitoreó la emisión del $^1\text{O}_2$ a 1270 nm. Como se mostró en la Sección 9.2.1, Lum presenta un espectro de emisión fluorescente que se extiende entre los 400 y 650 nm. Por lo tanto, es necesario investigar posibles interferencias de la emisión fluorescente de Lum en el infrarrojo cercano. En este sentido, a modo de control, se realizaron experimentos en soluciones en atmósfera saturada en N_2 . En estas condiciones, debido a la ausencia de O_2 disuelto en el medio, en caso de detectarse emisión en la región infrarroja, la misma es asignada a la sustancia en estudio. Los controles se realizaron en medio ácido (pD = 5,5) y medio alcalino (pD = 10,5). En las condiciones de trabajo en las que se realizaron las medidas de Φ_{Δ} , no se detectó luminiscencia a 1270 nm en N_2 para ninguna de las dos formas ácido-base de Lum estudiadas.

Las determinaciones de Φ_{Δ} se realizaron para la forma ácida excitando a 309 nm y para la forma alcalina excitando a 355 nm, usando diferentes energías en el láser. Como

sensibilizador de referencia se utilizó PNS ($\Phi_{\Delta} = 0,97 \pm 0,05$)⁵ (Sección 7.3.3). Se detectó emisión infrarroja por $^1\text{O}_2$ para ambas formas acido-base de Lum (Figura 10.9).

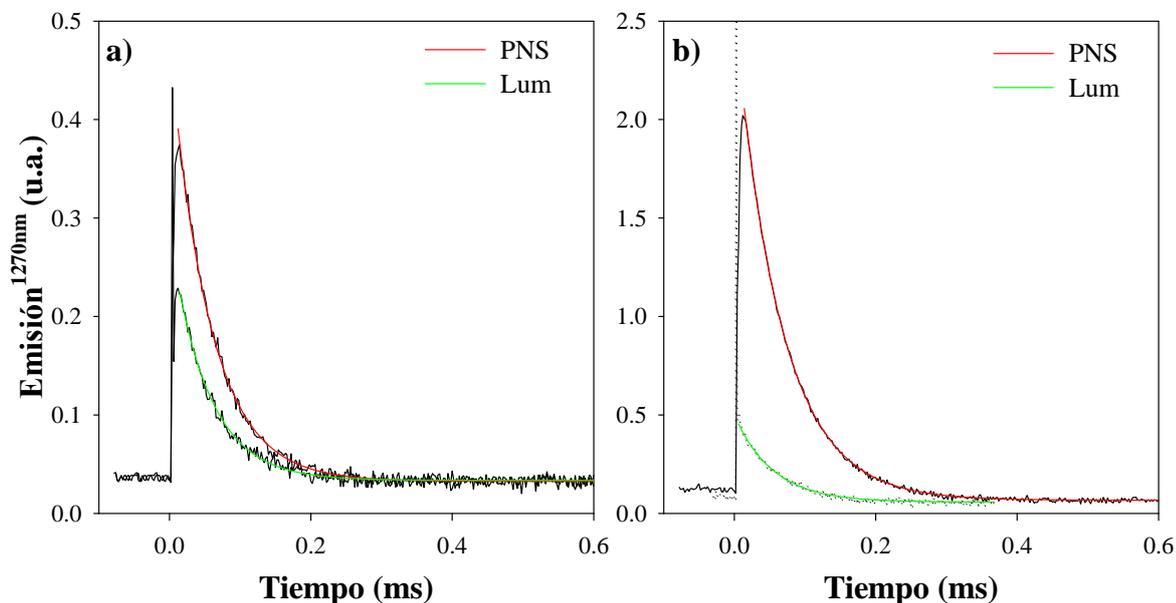


Figura 10.9: Emisión a 1270 nm de Lum y PNS, con sus respectivos ajustes monoexponenciales. a) pD = 5,5, $\lambda_{\text{exc}} = 309$ nm, E = 3,23 mW. b) pD = 10,5, $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, E = 17,0 mW.

Tal como se mencionó en el Capítulo 7, el Φ_{Δ} se calculó usando la ecuación (1), mediante el empleo del método comparativo. Brevemente, se graficó la intensidad de la señal del $^1\text{O}_2$ extrapolada a cero (factor pre-exponencial A), corregida por la fracción de luz absorbida y el tiempo de vida, en función de la energía del láser para la muestra y la referencia (Figura 10.10). La relación entre ambas pendientes es proporcional a la relación de rendimientos cuánticos, por lo que de allí se puede calcular el Φ_{Δ} de la muestra desconocida^{6,7},

$$\Phi_{\Delta}^{\text{Sens}} = \Phi_{\Delta}^{\text{Ref}} \frac{A^{\text{Sens}} \tau_{\Delta}^{\text{Ref}} (1 - 10^{-A^{\text{Ref}}})}{A^{\text{Ref}} \tau_{\Delta}^{\text{Sens}} (1 - 10^{-A^{\text{Sens}}})} \quad (1)$$

donde el superíndice Sens se refiere al sensibilizador en estudio y el superíndice Ref se refiere a la referencia. Siendo A y τ_{Δ} , el factor pre-exponencial y el tiempo de vida de $^1\text{O}_2$, respectivamente, obtenidos de la señal de emisión a 1270 nm. $\Phi_{\Delta}^{\text{Ref}}$ es el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ de la referencia (0,97). El otro factor que está presente en la ecuación 1, $[(1 - 10^{-A^{\text{Ref}}}) / (1 - 10^{-A^{\text{Sens}}})]$, se origina por la diferente cantidad de fotones

absorbidos por la muestra y por la referencia, y resultó ser muy similar a uno, debido a que se trabajó con valores de absorbancia de ambos muy similares. Los valores de Φ_{Δ} obtenidos fueron $0,49 \pm 0,03$ y $0,20 \pm 0,02$ para la forma ácida y alcalina, respectivamente. Estos resultados revelan que la capacidad de producción de $^1\text{O}_2$ de Lum depende fuertemente del pD. Por otro lado, los valores obtenidos son del mismo orden que los publicados en un trabajo previo, realizado con técnicas de estado estacionario.²

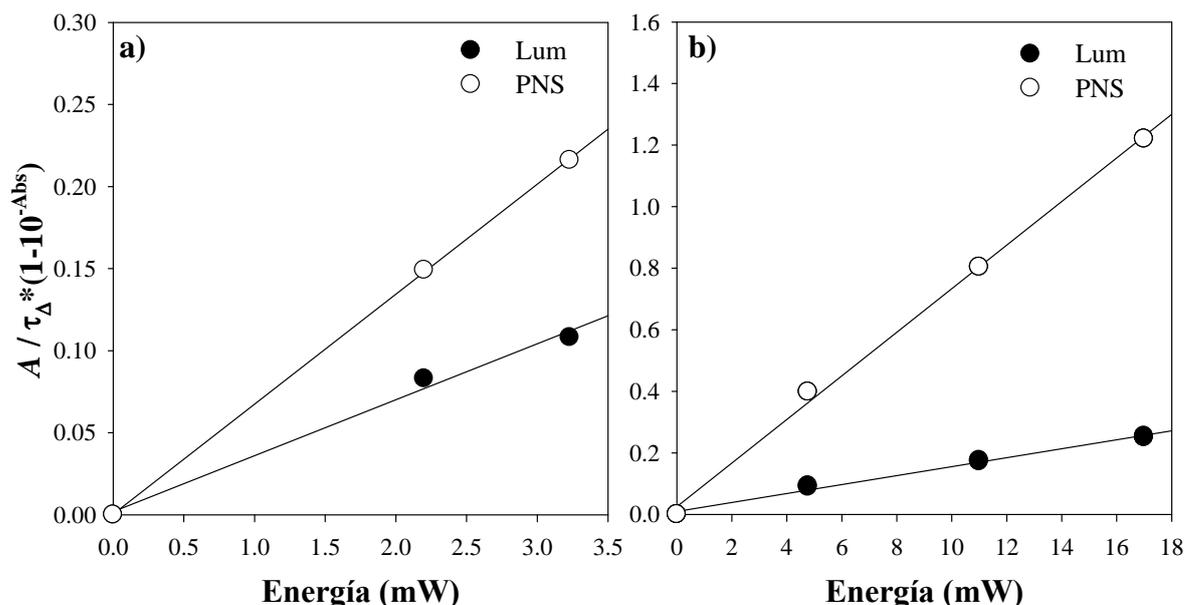


Figura 10.10: Intensidad de la señal de $^1\text{O}_2$ extrapolada a cero, corregida por la absorción y por τ_{Δ} en función de la energía del láser. a) pD = 5,5; $\lambda_{exc} = 309$ nm b) pD = 10,5; $\lambda_{exc} = 355$ nm.

Adicionalmente, se realizaron determinaciones de Φ_{Δ} en soluciones de Lum saturadas con O_2 . Para ello, las soluciones a analizar fueron previamente burbujeadas con O_2 (durante 15 minutos). Para ambas condiciones de pD, los valores de Φ_{Δ} obtenidos fueron idénticos, dentro del error experimental, a los obtenidos con soluciones equilibradas en aire. Este comportamiento ya había sido observado anteriormente en estudios realizados con técnicas de estado estacionario.²

Los valores de Φ_{Δ} obtenidos se pueden analizar teniendo en cuenta los resultados de fluorescencia presentados en el capítulo anterior; en el cual se mostró que el valor de Φ_F de la forma ácida es menor que el de la correspondiente forma alcalina. Se sugirió, entonces, que en la forma ácida debe ser más eficiente la desactivación del primer estado excitado singlete (S_1) por otra u otras vías diferentes a la emisión fluorescente. El análisis de los

valores de Φ_{Δ} obtenidos permite sugerir que en la forma ácida la eficiencia del cruzamiento inter-sistemas podría ser mayor que en la alcalina, justificando de esta forma, mayor Φ_{Δ} en la forma ácida y mayor Φ_F en la forma alcalina.

En base a los resultados hasta aquí mostrados (Φ_{Lum} , Φ_{Δ}^{Lum} , k_t^{Lum}) para las dos formas ácido-base de Lum, se puede concluir que este compuesto presenta una fotoestabilidad relativamente alta, es un buen productor de 1O_2 , y un débil desactivador del mismo. Dichas cualidades hacen de Lum un compuesto que debe ser considerado como un buen fotosensibilizador bajo irradiación UV-A y UV-B. Consecuentemente, Lum podría ser tenido en cuenta en aplicaciones en donde se requiera un fotosensibilizador de 1O_2 soluble en H_2O y que no se consume en el proceso. Como se explicará más adelante, la capacidad de este compuesto como fotosensibilizador no se limita sólo a la producción de 1O_2 .

10.4 Anión superóxido

Con el objeto de investigar la producción de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) durante la irradiación de Lum, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos: (i) irradiaciones en forma estacionaria en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y (ii) medidas de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en presencia un secuestrador de espín. Los experimentos en presencia de SOD aportan evidencia indirecta de la formación de $O_2^{\bullet-}$ en las soluciones irradiadas, pero aportan valiosa información sobre los mecanismos de reacción. Por otro lado los experimentos de EPR aportan evidencia directa de la formación de esta especie reactiva de oxígeno.

10.4.1 Experimentos en presencia de la enzima superóxido dismutasa

Se realizaron experimentos de irradiación continua en presencia de la enzima SOD, la cual cataliza la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 , eliminándolo del medio de reacción. Tal como se describió en la Sección 5.2.4, se realizaron fotólisis de soluciones de Lum, en presencia y ausencia de la enzima, y se determinó la concentración de Lum y H_2O_2 con el transcurso del tiempo de irradiación (Figura 10.11). En soluciones equilibradas con aire, en presencia de SOD la cantidad de H_2O_2 generada fue mucho mayor que en su ausencia (Figura 10.11b). La diferencia en la producción de H_2O_2 debe provenir del $O_2^{\bullet-}$ generado durante la fotólisis. Este resultado, por ende, sugiere fuertemente que en una solución de

Lum irradiada, se genera dicha especie reactiva, pero también implica la existencia de reacciones de recombinación que consumen la mayor parte del $O_2^{\cdot-}$ en ausencia de SOD. Asimismo, los resultados presentados en la Figura 10.11a), muestran una velocidad de consumo de Lum en presencia de SOD mayor que la observada en ausencia de la enzima, lo que sugiere que la SOD, al consumir rápidamente el $O_2^{\cdot-}$, podría evitar una reacción de anulación de radicales, por ejemplo entre $O_2^{\cdot-}$ y $Lum^{+\cdot}$, estimulando así el consumo de Lum.

Considerando estos resultados, se podrían proponer dos mecanismos para la formación de $O_2^{\cdot-}$ a partir de los estados excitados de Lum (Reacción 2): (i) reducción directa de O_2 por Lum^* (Reacción 3); (ii) mecanismo que consta de dos pasos, que involucra una primera etapa consistente en una transferencia de electrones entre los estados fundamental y excitado de Lum con la consecuente generación del par radical $Lum^{+\cdot}$ y $Lum^{\cdot-}$, y una segunda etapa en la cual este último reacciona con el O_2 para generar $O_2^{\cdot-}$ (Reacciones 4 y 5).

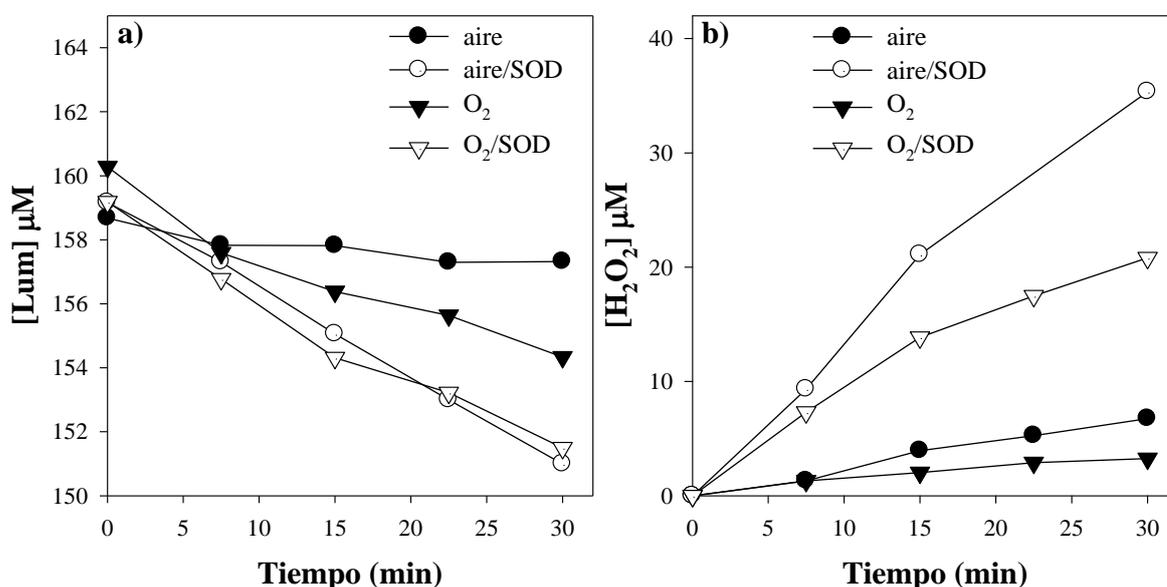
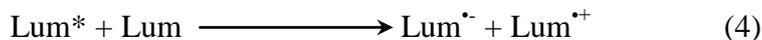
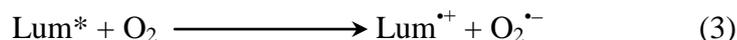
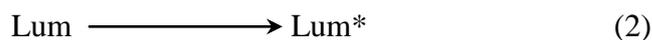


Figura 10.11.: Evolución a medida que se irradia una solución de Lum (~ 160 µM, pH = 5,5) de las concentraciones de a) Lum y b) H₂O₂. Experimentos realizados en aire y en atmósferas saturadas con O₂, en ausencia y en presencia de SOD (50 U / ml).



Con el objeto de investigar los dos mecanismos propuestos para la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Reacciones 3, 4 y 5), se realizaron experimentos de irradiación continua de Lum en soluciones saturadas con O_2 , en presencia y en ausencia de SOD. Dado que el O_2 es un importante desactivador de estados excitados tripletes, este experimento también podría aportar evidencia indirecta sobre la participación del estado excitado triplete de Lum ($^3\text{Lum}^*$) en la generación del $\text{O}_2^{\bullet-}$. Como se puede observar en la Figura 10.11, el incremento en la concentración de O_2 de la solución en ausencia de SOD, en lugar de un aumento, causó una disminución significativa en la velocidad de producción de H_2O_2 . Este comportamiento fue aún más notable en presencia de SOD. Este resultado experimental se puede interpretar sobre la base del siguiente análisis: como el O_2 no desactiva los estados singlete excitado de Lum ($^1\text{Lum}^*$), sino que es un desactivador eficiente de sus estados triplete (Capítulo 9), el comportamiento observado está a favor de la participación del $^3\text{Lum}^*$ en el proceso en estudio; por lo que las especies excitadas en las Reacciones 3 y 4 deben ser $^3\text{Lum}^*$. Ahora bien, si el $\text{O}_2^{\bullet-}$ se formara principalmente por la transferencia directa de electrones desde $^3\text{Lum}^*$ hacia O_2 (Reacción 3), la producción de H_2O_2 debería aumentar con la concentración de O_2 en presencia o en ausencia de SOD. Por otro lado, si el $\text{O}_2^{\bullet-}$ se formara principalmente a través de los dos pasos consecutivos representados por las Reacciones 4 y 5, desactivando el $^3\text{Lum}^*$ por O_2 debe disminuir la eficiencia relativa de la Reacción 4, y en consecuencia, la velocidad de formación de H_2O_2 debería disminuir con el aumento de la concentración de O_2 . Por lo tanto, los experimentos comparativos realizados en soluciones equilibradas con aire y saturadas con O_2 sugieren que $\text{O}_2^{\bullet-}$ se forma a través de las Reacciones 4 y 5 y que, en las mismas, Lum* representa al triplete de Lum.

10.4.2 Experimentos de EPR

Se irradiaron soluciones de Lum en presencia de un secuestrador de spin, el 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO) y se tomaron espectros a distintos tiempos de

irradiación. En los mismos se observó la generación de una señal que fue creciendo con el tiempo de irradiación, alcanzando un valor máximo a los cuatro minutos (Figuras 10.12a-c). Al analizar las señales, las constantes de acoplamiento indican claramente la presencia del aducto $\text{DMPO}^{\bullet}\text{-OOH}$.⁸ Este resultado sugiere que el DMPO ha atrapado $\text{O}_2^{\bullet-}$ presente en el medio y que la cantidad del mismo aumenta con el tiempo de irradiación. Se hicieron controles en ausencia de Lum, y en soluciones de Lum no irradiadas, y no se observó ninguna señal que correspondiera al aducto, lo cual corrobora que el aducto se forma como consecuencia de un proceso fotoquímico. Para confirmar la participación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ en la formación del aducto $\text{DMPO}^{\bullet}\text{-OOH}$, se realizaron experimentos similares en presencia de SOD (Sección 7.4.4). Como se muestra en la Figura 10.12d el agregado de esta enzima causa una importante disminución de la señal de EPR.

Los resultados del estudio por EPR son compatibles con los mostrados en la sección anterior, y permiten concluir que las soluciones acuosas aireadas de Lum generan $\text{O}_2^{\bullet-}$ cuando las mismas son expuestas a radiación UV. Del $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado, una pequeña proporción se dismuta a H_2O_2 y O_2 , mientras la mayor parte se oxida y vuelve a O_2 por reacción con otros radicales presentes en el medio.

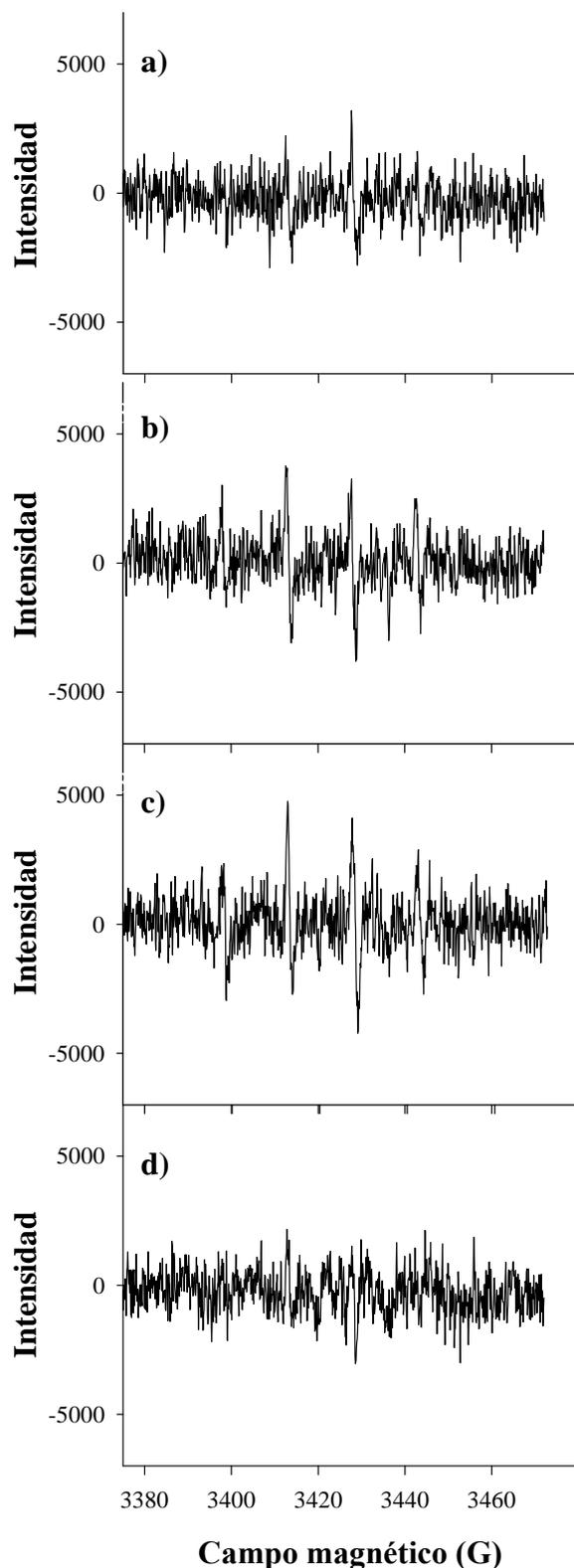
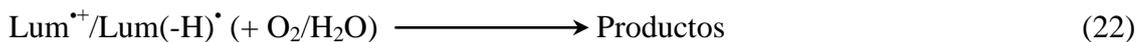
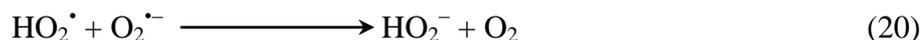
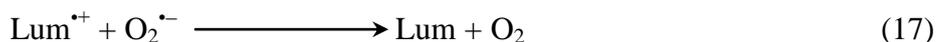
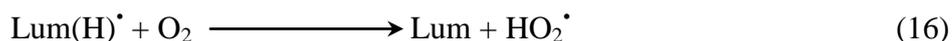
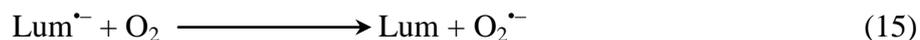
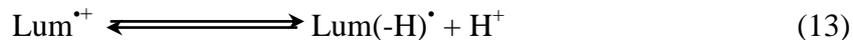
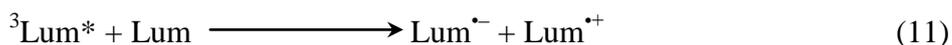
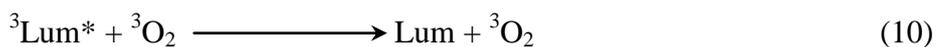
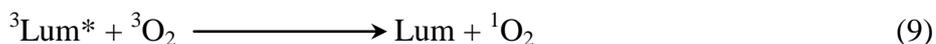


Figura 10.12: detección del aducto $\text{DMPO}^{\cdot}\text{-OOH}$ por análisis de EPR en soluciones acuosas de Lum y DMPO: a) luego de 40 s de irradiación, b) luego de 3 min de irradiación, c) luego de 4 min de irradiación y d) equivalente a (c) con el agregado de SOD (22 U / ml). $[\text{Lum}] = 0,1$ mM; $[\text{DMPO}] = 50\text{mM}$; $\text{pH} = 7,0$.

10.5 Mecanismos de reacción

Considerando en conjunto los resultados expuestos en este capítulo, es posible plantear un mecanismo de reacción general que permite explicar la producción de especies reactivas de oxígeno. Dicho mecanismo, representado por las ecuaciones 6 a 22, consiste en una serie de vías competitivas. Las reacciones predominantes cambian al variar las condiciones experimentales, lo cual justifica, por ejemplo los distintos comportamientos observados a distintas concentraciones de O₂.



Luego de la excitación de Lum, y la formación de su estado triplete excitado, ³Lum* (Reacciones 6 y 7), varias reacciones compiten para la desactivación de este último: entrecruzamiento de sistemas al estado basal singlete (Reacción 8), transferencia de

energía al oxígeno molecular para la formación de $^1\text{O}_2$ y regeneración de Lum (Reacción 9), una transferencia de electrones a su estado fundamental (Reacción 11) para generar el correspondiente par radical ($\text{Lum}^{\bullet-}/\text{Lum}^{\bullet+}$). Si se considera el comportamiento de otros compuestos relacionados, como pterinas^{9,10} y purinas^{11,12}, es muy probable que el radical anión y el radical catión de Lum estén en equilibrio con sus formas protonadas y desprotonadas ($\text{Lum}(\text{H})^{\bullet}/\text{Lum}(-\text{H})^{\bullet}$), respectivamente (Reacciones 12 y 13). La recombinación de ambos radicales (Reacción 14) explica el bajo rendimiento cuántico de consumo de Lum bajo condiciones anaeróbicas. En presencia de O_2 , $\text{Lum}^{\bullet-}/\text{Lum}(\text{H})^{\bullet}$ generan $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Reacciones 15 y 16), pero la recombinación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ con $\text{Lum}^{\bullet+}/\text{Lum}(-\text{H})^{\bullet}$ (Reacciones 17 y 18) explica el también bajo rendimiento cuántico de consumo de Lum medido en condiciones aeróbicas. Alternativamente, una baja proporción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se desproporciona y conduce a la escasa formación de H_2O_2 (Reacciones 19-21) medida en condiciones aeróbicas. De la misma manera una baja fracción de los radicales $\text{Lum}^{\bullet+}/\text{Lum}(-\text{H})^{\bullet}$ reaccionan con O_2 o con el solvente, o sufren otro tipo de reacciones (Reacción 22), conduciendo al consumo de Lum. Al estar presente en el medio de reacción la enzima SOD la velocidad de las reacciones 19-21 se incrementa, evitando por competencia la recombinación de radicales (Reacciones 17 y 18). En consecuencia, se observa una mayor producción de H_2O_2 y un mayor consumo de Lum.

10.6 Referencias

- 1 F. M. Cabrerizo, M. L. Dántola, A. H. Thomas, C. Lorente, A. M. Braun, E. Oliveros, A. L. Capparelli, *Chem. Biodiv.*, **2004**, 1, 1800-1811
- 2 M. P. Denofrio, A. H. Thomas, A. M. Braun, E. Oliveros, C. Lorente, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2008**, 200, 282-286
- 3 C. Lorente, A. H. Thomas, *Acc. Chem. Res.*, **2006**, 39, 395-402
- 4 G. Petroselli, R. Erra-Balsells, F. M. Cabrerizo, C. Lorente, A. L. Capparelli, A. M. Braun, E. Oliveros, A. H. Thomas, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2792-2799
- 5 Nonell, S., M. Gonzalez, and F. M. Trull., *Afinidad*. **1993**, 448, 445-450
- 6 G. Valduga, S. Nonell, E. Reddi, G. Jori, S. Braslavsky, *Photochemistry and Photobiology*, **1988**, 48, 1, 1-5
- 7 R. V. Bensasson, E. S. Land, T. G. Trescott, **1983**, Ed. Pergamon Press
- 8 E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 200, 1-16
- 9 C. Chahidi, M. Aubailly, A. Momzikoff, M. Bazin, R. Santus, *Photochem. Photobiol.* **1981**, 33, 641-649
- 10 P. N. Moorthy, E. Hayon, *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 1607-1613
- 11 L. P. Candéias, S. Steenken, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 1094-1099
- 12 A. Adhikary, A. Kumar, D. Becker, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 24171-24180

Capítulo 11

Fotosensibilización de 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato por Lumazina

Con el objeto de evaluar la capacidad de Lumazina (Lum) de actuar como fotosensibilizador del ADN o de sus componentes a través de mecanismos Tipo I (Capítulo 2), se buscó una molécula blanco que no reaccione significativamente con el $^1\text{O}_2$. Luego de evaluar diferentes aspectos se eligió para este estudio 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP). En primer lugar, trabajos previos han demostrado que este nucleótido no reacciona con $^1\text{O}_2$.^{1,2} Por otro lado, dAMP, por poseer una base púrica en su estructura, puede ser oxidada en procesos de transferencia de electrones y, por ende, es susceptible de sufrir fotooxidaciones Tipo I (Capítulo 2).³ Además, es altamente soluble en agua, lo cual permite trabajar en amplios intervalos de concentración en solución acuosa. Su valor de coeficiente de absorción molar a 260 nm ha sido publicado,⁴ por lo cual es fácil determinar su concentración espectrofotométricamente. Por último, este compuesto está disponible comercialmente con un grado de pureza aceptable.

Los experimentos se realizaron en dos condiciones de pH diferentes. Teniendo en cuenta el equilibrio ácido base de Lum (Capítulo 9), se trabajó a pH 5,5 y a pH 10,5 para estudiar el comportamiento de la forma ácida y alcalina, respectivamente. Adicionalmente, deben considerarse, los equilibrios ácido-base de dAMP (Sección 2.2.2). Sin embargo, para este nucleótido el único equilibrio importante en las condiciones experimentales usadas es el que tiene lugar en el grupo fosfato, $\text{p}K_{\text{a}2}(\text{PO}_3\text{H}_2) = 6,22$ (Tabla 2.1). Por otra parte, la porción de la molécula que se oxida en los procesos de transferencia de electrones es también la base nitrogenada. Por consiguiente, es esperable que el equilibrio ácido-base del fosfato no afecte de manera sustancial el comportamiento del nucleótido en procesos fotosensibilizados.

Debido a la dependencia de los espectros de absorción de Lum con el pH (Capítulo 9) y teniendo en cuenta la posición de los máximos de absorción, las soluciones ácidas fueron irradiadas a 300 nm, con el filtro de corte ya mencionado en el Capítulo 5, mientras que soluciones alcalinas fueron irradiadas a 350 nm. Los espectros de absorción y la forma ácido-base predominante de ambas especies a pH = 5,5 y 10,5 se muestran en la Figura 11.1 Bajo estas condiciones experimentales, sólo es excitada Lum mientras que dAMP no absorbe radiación.

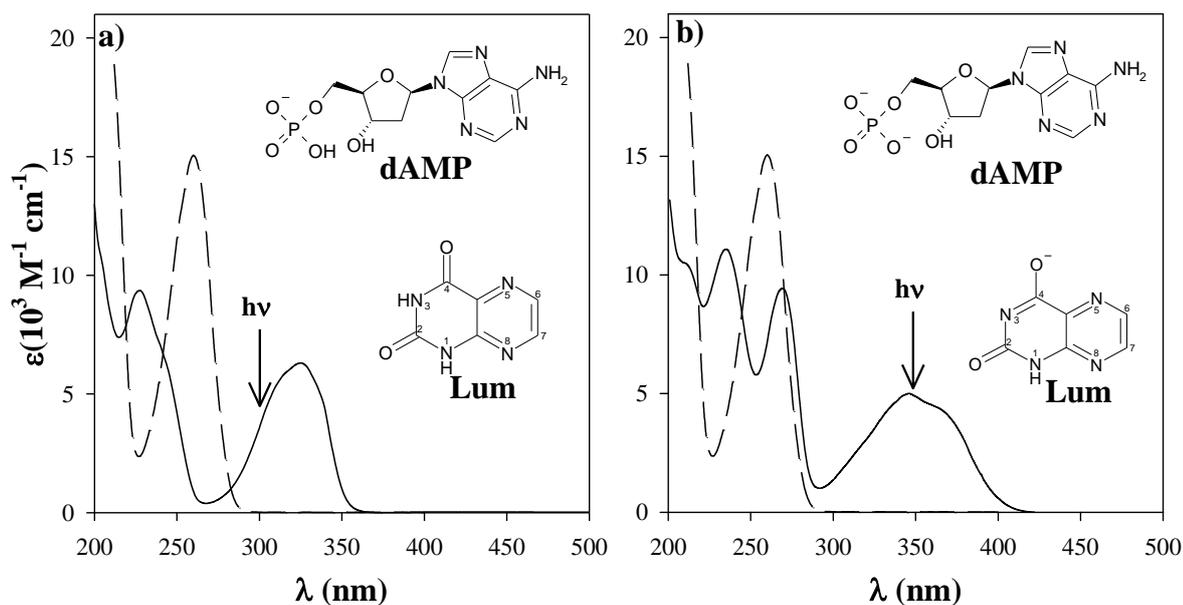


Figura 11.1: Estructuras químicas y espectros de absorción de dAMP y Lum. a) pH = 5,5. b) pH = 10,5. Lum: líneas continuas, dAMP: discontinuas.

11.1 Análisis espectroscópico

Tal como se describió en el Capítulo 5, se prepararon soluciones acuosas aireadas de Lum y dAMP en dos condiciones de pH, y se las sometió a radiación continua durante diferentes períodos de tiempo, luego del cual se evaluó la magnitud de la reacción mediante espectrofotometría.

11.1.1 Experimentos en medio ácido

En la Figura 11.2 se puede observar que la absorción entre 240 y 280 nm decrece con el tiempo de irradiación; sin embargo la absorción a 340 nm, dónde sólo absorbe Lum, no se altera. Un primer análisis de estos resultados sugiere que, mientras el nucleótido se consume durante la irradiación, la concentración del fotosensibilizador permanece inalterada.

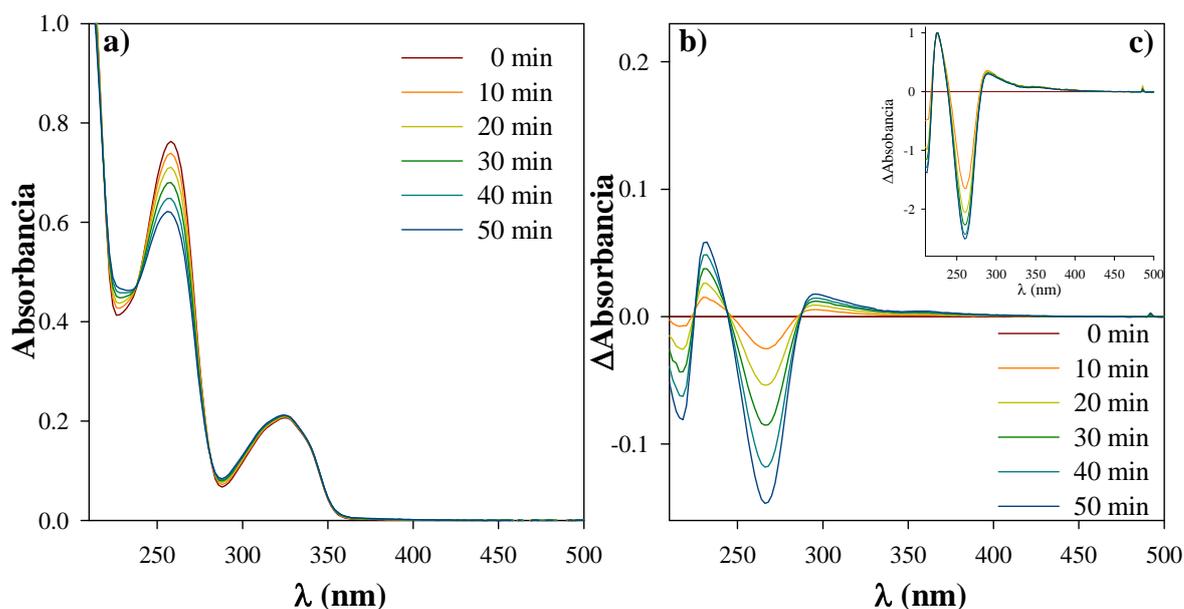


Figura 11.2: a) Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas. b) Espectros diferencia. c) Espectros diferencia normalizados $[Lum]_0 = 70 \mu M$; $[dAMP]_0 = 115 \mu M$; $pH = 5,5$; $\lambda_{exc} = 300 \text{ nm}$; camino óptico = $0,4 \text{ cm}$.

Para descartar que los cambios químicos detectados se deban a reacciones térmicas o a la fotólisis de los reactivos, se realizaron experimentos control. En el primer control, soluciones acuosas de dAMP y Lum se conservaron en la oscuridad y a temperatura ambiente durante distintos períodos de tiempo. Estos ensayos se llevaron a cabo sobre soluciones con distintas concentraciones de nucleótido y Lum. En todos los casos se observó que los espectros de absorción de dichas soluciones no sufrieron modificaciones aún después de 90 minutos. El segundo control consistió en irradiar soluciones acuosas de dAMP en ausencia de Lum, respetando las condiciones de irradiación empleadas sobre las mezclas. Aún luego de 90 minutos, no se observaron cambios espectrales en dicho control. Por último, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo 10, se llevó a cabo un tercer experimento control, en el cual se irradiaron soluciones de Lum en ausencia de dAMP con $\lambda = 300 \text{ nm}$; y como era de esperar, luego de 90 minutos no se observaron cambios significativos en los espectros de absorción.

11.1.2 Experimentos en medio alcalino

Al realizar experimentos similares a los detallados en la sección anterior, a $pH = 10,5$ e irradiando con $\lambda = 350 \text{ nm}$, se observa que, a diferencia de lo observado en medio

ácido, los cambios espectrales registrados en estas condiciones son muy pequeños; lo que sugiere que en medio alcalino Lum no es capaz de fotosensibilizar e inducir cambios químicos en la molécula de dAMP (Figura 11.3).

Como era de esperar, al realizar los controles mencionados en la sección anterior, no se observaron cambios espectrales en los mismos al cambiar el pH del experimento.

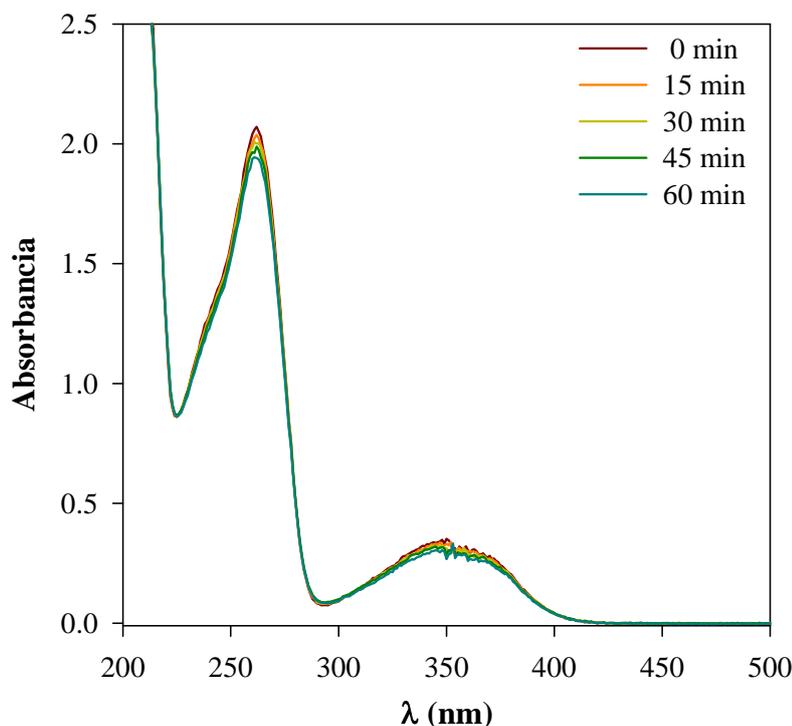


Figura 11.3: a) Evolución de los espectros de absorción en soluciones acuosas aireadas. $[Lum]_0 = 70 \mu M$; $[dAMP]_0 = 115 \mu M$; $pH = 10,5$; $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$; camino óptico = 1 cm.

11.2 Análisis cromatográfico

11.2.1 Experimentos en medio ácido

En la Figura 11.4 (a-d) se muestran los cromatogramas obtenidos para muestras de nucleótido y sensibilizador irradiadas en presencia de O_2 durante distintos períodos de tiempo. Como se puede observar, a medida que aumenta el tiempo de irradiación el área del pico correspondiente a Lum no se modifica mientras que el área del pico correspondiente a dAMP disminuye significativamente. Asimismo, aparece un nuevo pico con tiempo de retención (t_r) 10,0 min y espectro de absorción muy similar al de dAMP, cuya área a 260 nm se ve incrementada a medida que transcurre el tiempo de irradiación. (Figura 11.5). El espectro del producto (Figura 11.5) es muy similar al espectro de dAMP

(Figura 11.1). El máximo de la banda se encuentra a 260 nm para el producto y a 258 para dAMP. Se aprecia en el espectro, que este producto no absorbe por encima de 290 nm. Por lo tanto, la formación del mismo durante la reacción no justifica el aumento de absorbancia observado entre 280 y 350 nm en los espectros de absorción de las muestras irradiadas. Es posible que uno o más productos con absorbancia en ese intervalo de longitudes de onda sean retenidos por la columna cromatográfica.

Se realizaron experimentos modificando las concentraciones iniciales de dAMP y Lum, siempre manteniendo la relación entre las concentraciones de ambas aproximadamente constante ($\sim 1,3 - 2$), siendo siempre la mezcla más concentrada en nucleótido. Los resultados obtenidos en estos experimentos fueron similares a los expuestos en esta sección. En todos los casos, mientras la concentración de dAMP disminuyó con el tiempo de irradiación, la de Lum se mantuvo constante. Asimismo, siempre se observó la formación del mismo producto de reacción.

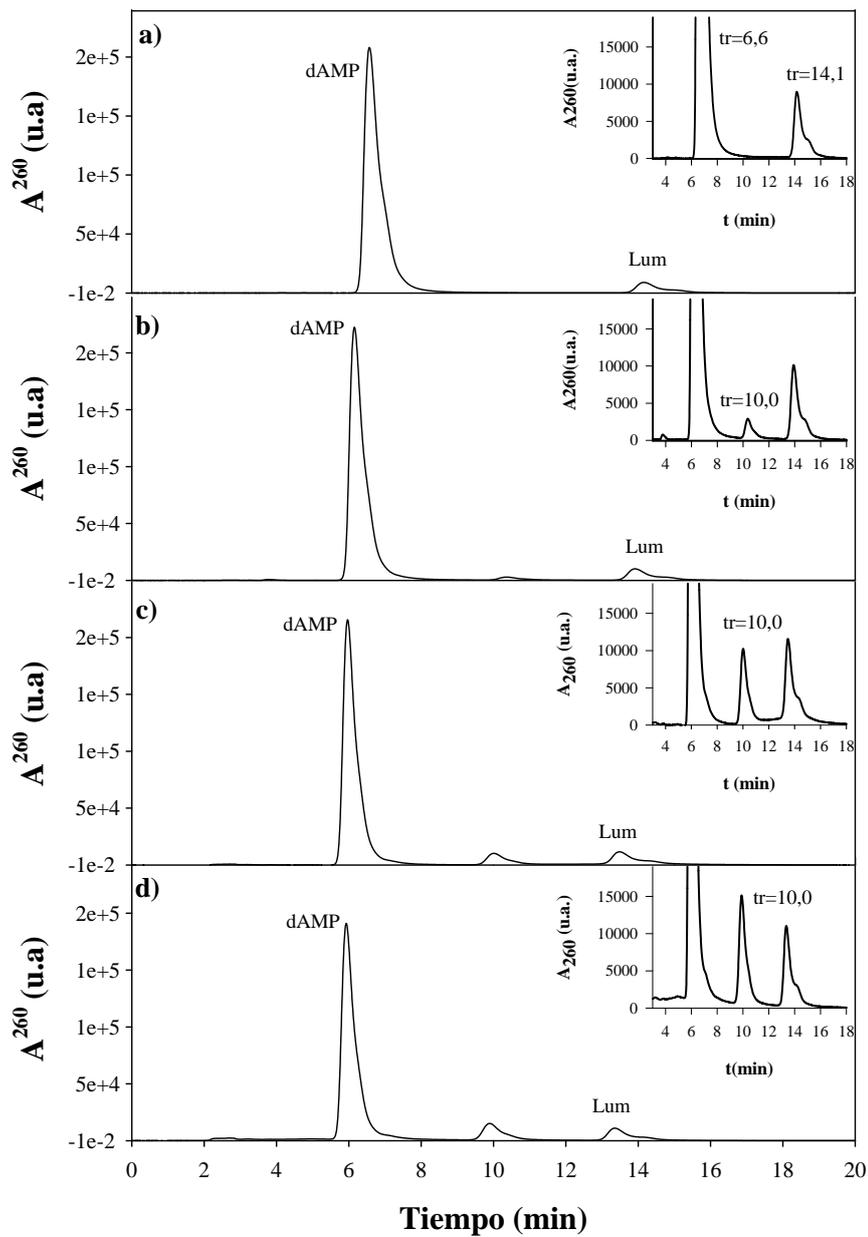


Figura 11.4 Cromatogramas registrados para una solución de Lum y dAMP. $[Lum]_0 = 123 \mu M$ y $[dAMP]_0 = 200 \mu M$. a) $t = 0$ b) $t = 5$ c) $t = 15$ y d) $t = 35$ min. $\lambda_{exc} = 300$ nm; $\lambda_{análisis} = 260$ nm; Equipo: HPLC 1; Fase móvil: Sistema III.

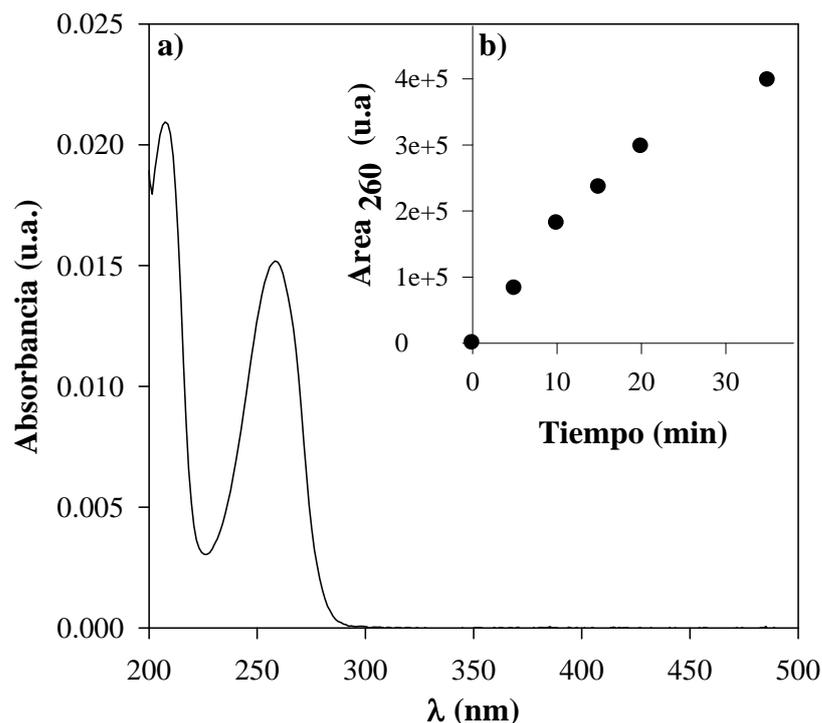


Figura 11.5: a) Espectro del producto de $t_r = 10$ min separado por HPLC. b) Evolución del área del producto en función del tiempo. $[Lum]_0 = 123 \mu M$; $[dAMP]_0 = 200 \mu M$; $pH = 5,5$; Equipo: HPLC-1; Fase móvil: Sistema III.

Los perfiles de concentración obtenidos a partir de las áreas de los picos y las correspondientes curvas de calibración muestran que la concentración de dAMP disminuye con el tiempo de irradiación mientras que la concentración de Lum permanece constante, para los intervalos de tiempo estudiados, y que este comportamiento es independiente de las concentraciones iniciales de los reactivos (Figura 11.6).

Al analizar mediante HPLC los controles anteriormente mencionados, se obtuvieron resultados coincidentes con los registrados para el análisis espectral. Es decir, para los períodos de tiempo analizados no hay reacción térmica entre los reactivos, y no se evidencia consumo de dAMP ni Lum, cuando se fotolizan uno en ausencia del otro.

A partir de estos resultados, se puede afirmar que Lum es capaz de sensibilizar dAMP. Es decir, la molécula de dAMP es modificada químicamente como resultado de la absorción inicial de radiación por Lum.

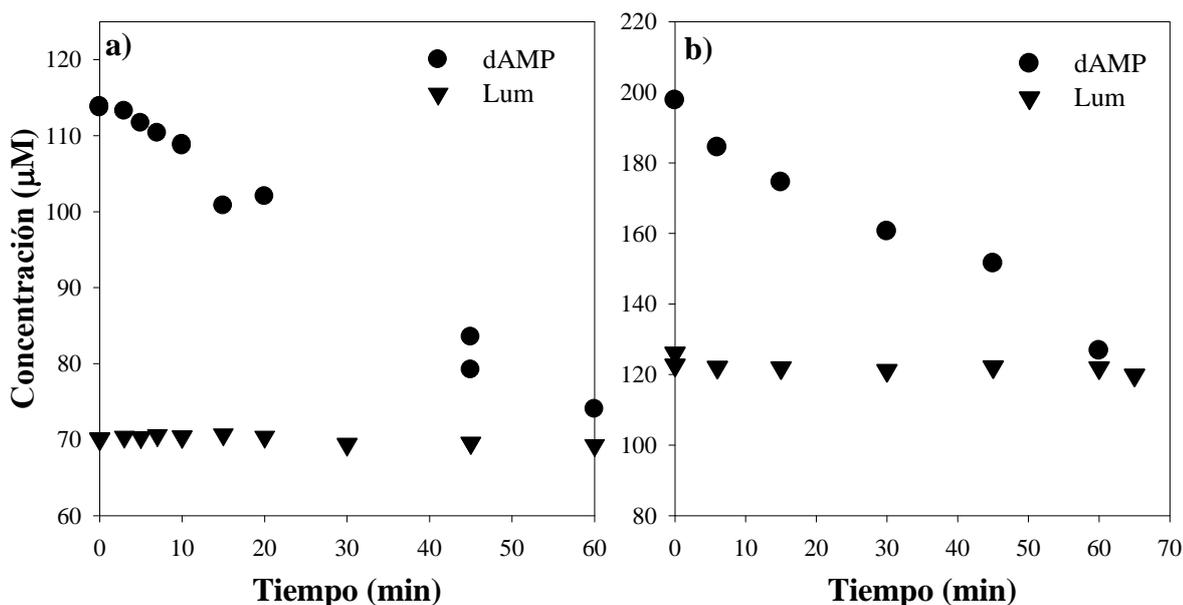


Figura 11.6: Evolución de las concentraciones de dAMP y Lum en soluciones acuosas aireadas en función del tiempo de irradiación. a) $[dAMP]_0 = 115 \mu M$; $[Lum]_0 = 70 \mu M$; b) $[dAMP]_0 = 200 \mu M$; $[Lum]_0 = 123 \mu M$; $\lambda_{exc} = 300 \text{ nm}$; pH = 5,5. Equipo: HPLC-1; Fase móvil: Sistema III.

11.2.2 Experimentos en medio alcalino

A diferencia de lo observado en medio ácido, cuando mezclas de Lum y dAMP se irradian en medio alcalino en presencia de O_2 no se observa cambio significativo en la concentración de dAMP a medida que aumenta el tiempo de irradiación (Figura 11.7). A su vez no se detectó el producto ($t_r = 10,0$ minutos) observado en medio ácido para ninguna de las muestras irradiadas en medio alcalino. A partir de estos resultados, coincidentes con el análisis espectral (Sección 11.1.2), es posible concluir que Lum no fotosensibiliza dAMP en medio alcalino. Cabe preguntarse en este punto por qué existe fotosensibilización a pH = 5,5, pero no a 10,5. Como se dijo al principio de este capítulo, dAMP no cambia su ionización en la porción purínica en este intervalo de pH, por lo que podría esperarse que la susceptibilidad a sufrir el proceso fotosensibilizado no cambie tampoco. Si este fuera el caso habría que pensar que es la ionización de Lum la responsable de que el proceso fotosensibilizado no ocurra en medio alcalino. Se volverá sobre este punto más adelante en este capítulo. Por otra parte, como era de esperar, al analizar mediante HPLC los controles, no se observaron cambios en las concentraciones de los reactivos.

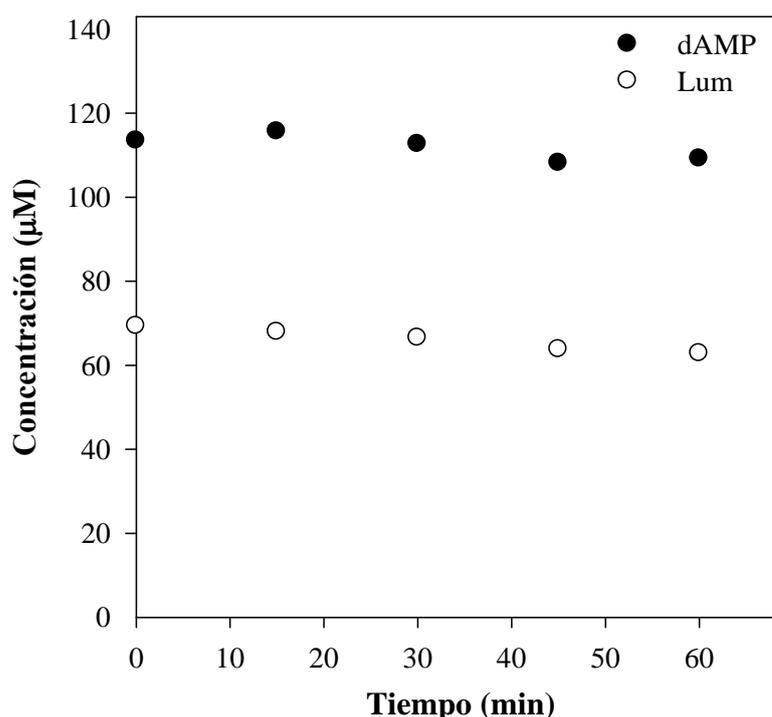


Figura 11.7: Evolución de las concentraciones de Lum y dAMP en función del tiempo de irradiación. $[Lum]_0 = 70 \mu M$ y $[dAMP]_0 = 115 \mu M$; $pH = 10,5$; $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$. Equipo: HPLC-1; Fase móvil: Sistema III.

11.3 Producción de H_2O_2

Se analizó la producción de agua oxigenada (H_2O_2) en los experimentos de fotosensibilización, según el método descrito en el Capítulo 6. Se detectó la presencia de H_2O_2 , en soluciones aireadas conteniendo Lum y dAMP a $pH = 5,5$ expuestas a radiación, indicando que como producto del proceso fotosensibilizado se genera esta especie reactiva de oxígeno. Se realizaron varios experimentos partiendo de distintas concentraciones iniciales de Lum y dAMP y en todos los casos se observó un aumento de la concentración de H_2O_2 con el tiempo de irradiación. En la Figura 11.8, se puede apreciar la producción de H_2O_2 en el experimento correspondiente a la Figura 11.6a). La velocidad de producción de H_2O_2 obtenida en dichas condiciones fue $0,45 \pm 0,08 \mu M/min$ mientras que la velocidad de consumo de dAMP en ese experimento fue $0,70 \pm 0,05 \mu M/min$. Con estos resultados, se analizó la relación entre la producción de H_2O_2 y la velocidad inicial de consumo de dAMP, lo cual arrojó una relación de $0,7 \pm 0,2$.

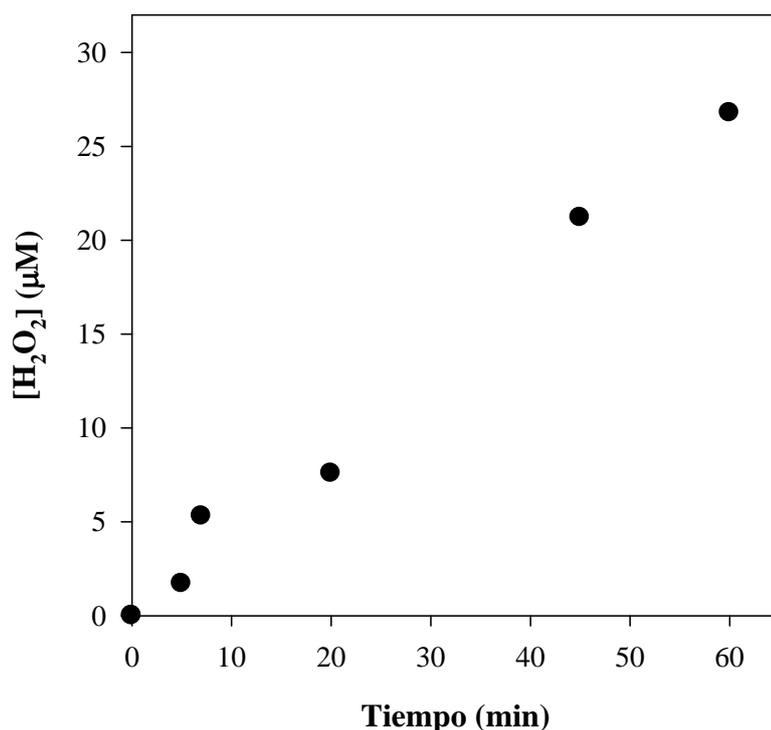


Figura 11.8: Formación de H₂O₂ en soluciones de Lum y dAMP en función del tiempo de irradiación. pH = 5,5; $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$; [dAMP]₀ = 115 µM; [Lum]₀ = 70 µM.

Se realizaron experimentos similares a pH alcalino, y se observó que la producción de H₂O₂ fue despreciable. Asimismo, se analizó la producción de dicha especie reactiva en los controles, y como era de esperar, se obtuvieron cantidades despreciables.

11.4 Participación del oxígeno

Con el objeto de evaluar la participación del O₂ en la reacción de sensibilización de dAMP por Lum, se realizaron diferentes experimentos: (i) Investigación del consumo de O₂ durante la irradiación de las soluciones; y (ii) Evaluación de la dependencia del consumo de reactivos con la concentración de O₂, para lo cual las irradiaciones de las mezclas se realizaron en atmósferas de Ar y saturadas con O₂.

11.4.1 Evaluación del consumo de oxígeno

Se monitoreó la evolución de la concentración de O₂ disuelto durante la irradiación, usando un electrodo selectivo en una celda cerrada (Sección 6.5). En este estudio se trabajó con concentraciones más altas de dAMP (~ 250 µM) ya que la concentración de O₂ en una solución acuosa saturada con aire a temperatura ambiente es aproximadamente 240 µM.

Por lo tanto, se deben realizar los experimentos con concentraciones relativamente elevadas de la molécula blanco, de modo tal que el consumo del O₂ disuelto sea significativo y pueda ser medido con el mínimo error posible.

En la Figura 11.9 se muestran los resultados obtenidos en un experimento realizado a pH 5,5, donde puede apreciarse que la concentración de O₂ disminuye con el tiempo de irradiación. El consumo de O₂ disuelto observado sugiere que la reacción fotosensibilizada por Lum consiste en una oxidación de dAMP a expensas del O₂ presente en el medio. Se realizaron experimentos control, en ausencia de dAMP, con el objeto de chequear si el consumo de O₂ proviene de la fotólisis de Lum. Los resultados demuestran que el proceso descrito consiste indudablemente en la oxidación de dAMP.

A partir del análisis por HPLC de las soluciones irradiadas en estos experimentos, se pudo obtener la variación en la concentración de dAMP. La misma fue comparada con el consumo de O₂. La relación entre ($\Delta[\text{O}_2]/\Delta[\text{dAMP}]$) fue calculada para distintos tiempos de irradiación (45-90 min) obteniéndose un valor de $1,3 \pm 0,2$. Este resultado muestra que la estequiometría global del proceso fotosensibilizado no es simple y podría estar indicando que el consumo de O₂ se debe no sólo a la reacción de dAMP, sino también a la de alguno de sus productos.

En contraste con lo expuesto anteriormente, no se observó consumo de O₂ significativo en medio alcalino, lo cual refuerza la hipótesis que solo la forma ácida de Lum actúa como un eficiente fotosensibilizador de dAMP.

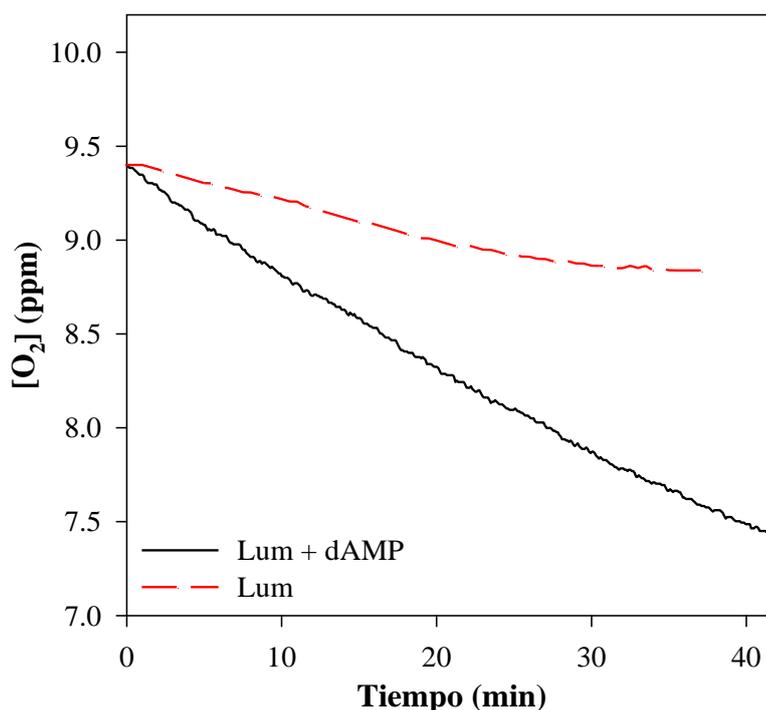


Figura 11.9: Evolución de la concentración de O₂ disuelto en una solución de Lum y dAMP en función del tiempo de irradiación. [dAMP]₀ = 247 μM; [Lum]₀ = 160 μM; pH = 5,5; λ_{exc} = 300 nm. Experimento control: fotólisis de Lum (170 μM) a pH = 5,5 en ausencia de dAMP.

11.4.2 Dependencia del consumo de dAMP con la concentración de oxígeno

En otra serie de experimentos, llevada a cabo utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico, soluciones de Lum y nucleótido fueron irradiadas en ambas condiciones de pH previamente equilibradas con Ar u O₂. Con fines comparativos, se utilizaron las mismas condiciones descritas en las secciones anteriores para los experimentos realizados en soluciones equilibradas con aire.

En la Figura 11.10 se muestran los espectros de las soluciones equilibradas en Ar, a distintos tiempos de irradiación. Es posible apreciar que, en estos experimentos no se detectaron cambios espectrales ni variaciones significativas en las concentraciones de Lum y dAMP aún luego de 80 minutos de irradiación. Estos resultados muestran que el O₂ no sólo participa en el proceso fotosensibilizado, sino que es indispensable para que se produzca consumo de sustrato.

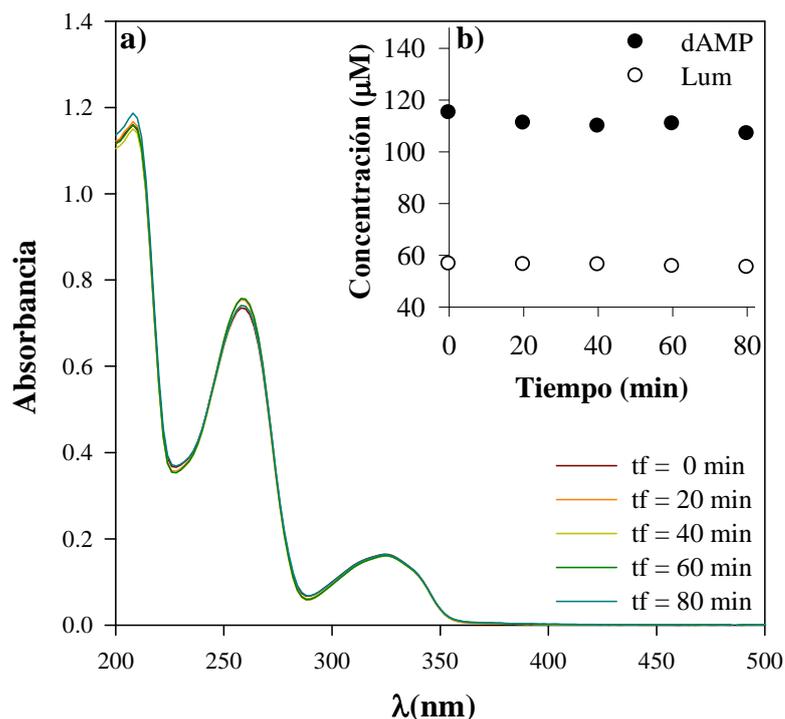


Figura 11.10: Irradiación de una solución de Lum y dGMP en atmósfera de Ar. a) pH = 5,5; $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$; $[\text{Lum}]_0 = 60 \mu\text{M}$; $[\text{dAMP}]_0 = 105 \mu\text{M}$ y b) pH = 10,5; $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$; $[\text{Lum}]_0 = 60 \mu\text{M}$; $[\text{dAMP}]_0 = 100 \mu\text{M}$. Insertos: Variación de la concentración de dAMP en función del tiempo de irradiación.

Asimismo se realizaron experimentos en atmósfera saturada con O_2 , y los resultados se compararon con los obtenidos para soluciones aireadas. En la Figura 11.11 se muestran los perfiles de concentración obtenidos por HPLC, en los cuales se puede ver que la velocidad de consumo de dAMP en solución aireada es mayor que en atmósfera saturada con O_2 . Teniendo en cuenta que el O_2 es un desactivador típico de los estados excitados triplete y, en cambio, no desactiva significativamente los estados excitados singlete de Lum (Capítulo 9), los resultados aquí obtenidos permiten inferir que el estado excitado triplete de Lum está involucrado en el mecanismo.

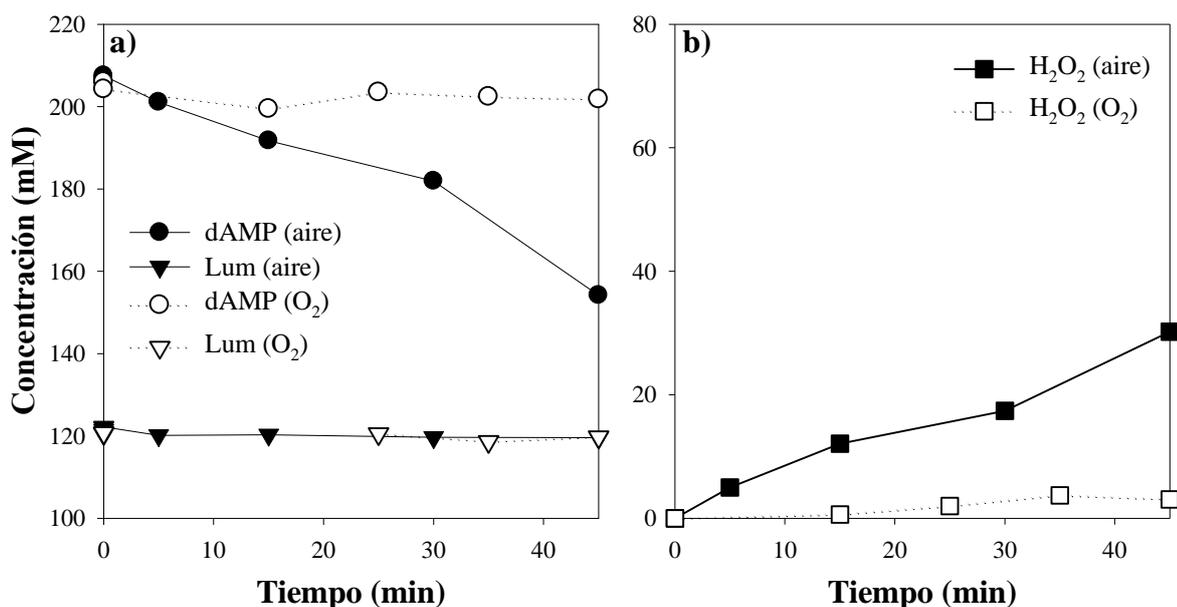


Figura 11.11: Evolución de la concentración de dAMP, Lum y H₂O₂ en solución en función del tiempo de irradiación. pH = 5,5; $\lambda_{exc} = 300$ nm; [Lum]₀ = 120 μ M, [dAMP]₀ = 210 μ M. Equipo: HPLC-1; Fase móvil: Sistema III.

11.5 Participación del oxígeno singlete

Los resultados presentados hasta ahora, tales como el consumo de dAMP y O₂, la producción de H₂O₂, y la concentración constante de Lum durante la reacción, demuestran claramente que Lum fotosensibiliza la oxidación de dAMP bajo radiación UV solamente a pH 5,5. Estos resultados son compatibles con los dos mecanismos de fotosensibilización, Tipo I y Tipo II. Como se dijo anteriormente, dAMP es muy poco reactivo frente al oxígeno singlete (¹O₂) y, por ende, la oxidación de dAMP por ¹O₂ podría ser descartada *a priori* como mecanismo de fotosensibilización para este nucleótido. Sin embargo, dado que Lum es un buen productor de ¹O₂ ($\Phi_{\Delta} = 0,49$ en medio ácido) y que la oxidación de dAMP por ¹O₂, aunque muy lenta, ocurre², se decidió evaluar el rol del ¹O₂ en la oxidación de dAMP fotosensibilizada por Lum a pH = 5,5. Para ello se realizó un estudio cinético y la fotólisis comparativa en H₂O y D₂O.

Para el análisis cinético se utilizó la ecuación 1 que expresa la velocidad inicial de reacción química entre ¹O₂ y dAMP:

$$(d[\text{dAMP}]/dt)_0 = -k_r^{\text{dAMP}} [^1\text{O}_2] [\text{dAMP}]_0 \quad (1)$$

La concentración de estado estacionario de ¹O₂ en una solución irradiada de Lum y

dAMP puede calcularse usando la ecuación 2:

$$[{}^1\text{O}_2] = q_{p,\lambda}^v \cdot \Phi_{\Delta} / (k_d + k_t^{\text{Lum}} [\text{Lum}] + k_t^{\text{dAMP}} [\text{dAMP}]_0) \quad (2)$$

donde $q_{p,\lambda}^v$ es la intensidad de fotones absorbidos por Lum y Φ_{Δ} es el rendimiento cuántico de producción de ${}^1\text{O}_2$. k_t^{dAMP} y k_t^{Lum} son las constantes de velocidad de desactivación total de ${}^1\text{O}_2$ por dAMP ($(4,1 \pm 0,4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)² y Lum ($(27 \pm 2) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Capítulo 10), respectivamente, y k_d la constante de desactivación de ${}^1\text{O}_2$ no radiativa. Entonces, para un dado experimento de irradiación continua, es posible calcular la velocidad inicial de reacción ($(d[\text{dAMP}]/dt)_0$) entre ${}^1\text{O}_2$ y dAMP, a partir de la ecuación 1, utilizando el valor de k_r^{dAMP} ($(8 \pm 3) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)², la concentración de ${}^1\text{O}_2$ calculada con la ecuación 2 y la concentración inicial de dAMP. Suponiendo que k_r^{dAMP} y k_t^{dAMP} en H_2O son iguales a los determinados en D_2O , se calcularon valores de $(d[\text{dAMP}]/dt)_0$ para distintas concentraciones experimentales. Por ejemplo, se obtuvo un valor de $3,3 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}/\text{min}$ para la velocidad inicial de consumo de dAMP por ${}^1\text{O}_2$ cuando la concentración inicial de dAMP fue $194 \mu\text{M}$ y la de Lum $123 \mu\text{M}$. Este valor es despreciable frente a la velocidad experimental de consumo de dAMP que se midió en un experimento realizado en esas condiciones ($1,06 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$). Cálculos realizados para otras condiciones experimentales arrojaron siempre resultados similares, indicando, como se esperaba, que la participación del ${}^1\text{O}_2$ es despreciable en la reacción de fotosensibilización de dAMP por Lum en medio ácido.

Para corroborar la hipótesis anterior, se realizaron fotólisis comparativas en H_2O y D_2O . La vida media del ${}^1\text{O}_2$ es mayor en D_2O ⁵, por lo tanto la concentración de ${}^1\text{O}_2$ de estado estacionario será mayor y también la velocidad de reacción entre dAMP y ${}^1\text{O}_2$. En consecuencia, si dicha reacción contribuyera en forma apreciable al consumo total de dAMP en el proceso fotosensibilizado, debería observarse un aumento en la velocidad de consumo de dAMP cuando el experimento se realice en D_2O . Se irradiaron soluciones aireadas de Lum y dAMP utilizando D_2O como solvente. Luego se comparó la velocidad de consumo de dAMP respecto a aquella obtenida en solución acuosa (utilizando concentraciones iniciales similares). Se observó que en ambos experimentos la velocidad obtenida fue del mismo orden, indicando que el ${}^1\text{O}_2$ no participa en el mecanismo (Figura 11.12).

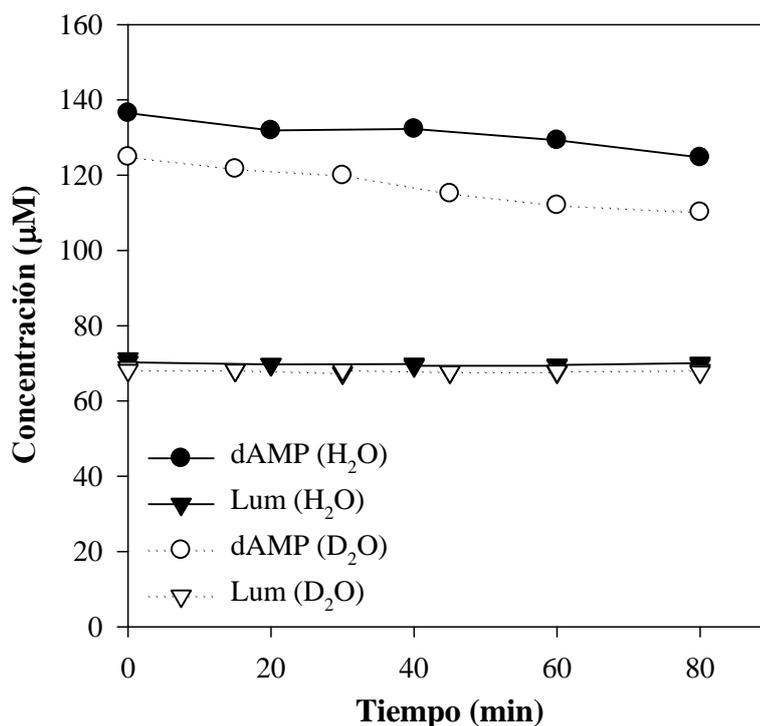


Figura 11.12: Evolución de las concentraciones de dAMP y Lum en soluciones preparadas en H₂O y D₂O. $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$. Experimento en H₂O: [dAMP]₀ = 135 µM; [Lum]₀ = 70 µM; pH = 5,5. Experimento en D₂O: [dAMP]₀ = 125 µM; [Lum]₀ = 70 µM; pD = 5,5. Equipo: HPLC-1; Fase móvil: Sistema II.

Este resultado, junto con los obtenidos en la Sección 11.4, no es compatible con un mecanismo Tipo II en el cual se forma $^1\text{O}_2$ por transferencia de energía desde el estado excitado triplete del sensibilizador al O₂ disuelto.

En el Capítulo 9 se demostró que el estado excitado singlete de Lum no es desactivado por O₂, esto refuerza la sospecha de que el estado excitado involucrado en el mecanismo de fotosensibilización de dAMP es el triplete.

11.6 Participación del anión superóxido

Con el objeto de investigar la participación del anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) en el mecanismo de fotosensibilización en medio ácido, se realizaron dos tipos de experimentos: (i) irradiaciones en forma estacionaria en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y (ii) medidas de resonancia paramagnética electrónica (EPR) en presencia un secuestrador de espin. Los experimentos en presencia de SOD aportan evidencia indirecta de la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en las soluciones irradiadas, pero aportan valiosa información sobre los mecanismos de reacción. Por otro lado, los experimentos de EPR aportan

evidencia directa de la formación de esta especie reactiva de oxígeno.

11.6.1 Experimentos en presencia de la enzima superóxido dismutasa

Se realizaron experimentos de irradiación continua en presencia de la enzima SOD, la cual cataliza la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 , eliminándolo del medio de reacción. Tal como se describió en la Sección 5.2.4, se irradiaron soluciones ácidas (pH = 5,5) de Lum y dAMP en presencia y en ausencia de la enzima con el objeto de identificar si el mencionado anión está presente o no en el proceso. A distintos tiempos de irradiación se determinaron las concentraciones de ambas especies por HPLC y la de H_2O_2 por el método enzimático colorimétrico (Sección 6.4). En presencia de SOD tanto la velocidad de consumo de dAMP como la de formación de H_2O_2 se vieron incrementadas (Figura 11.13). Tal como se puede observar en la figura, cada punto de la curva está acompañado de su desviación estándar, la cual se obtuvo luego de realizar el experimento por cuadruplicado. Por el contrario no se observó consumo de Lum tanto en presencia como en ausencia de la enzima. Por último, en ambas condiciones se observó por HPLC una distribución de productos similares a los descritos en la Sección 11.2.1. El área del producto predominante se incrementa con mayor velocidad cuando la enzima está presente durante la irradiación (Figura 11.13). Estos resultados sugieren que cuando se elimina el $O_2^{\bullet-}$ del medio, el proceso que tiene lugar es el mismo que en ausencia de la enzima, pero ocurre a mayor velocidad.

Suponiendo que SOD sólo elimina el $O_2^{\bullet-}$ del medio, la variación en las velocidades de consumo de reactivos y formación de productos indica que el $O_2^{\bullet-}$ está presente en el sistema y participa de alguna forma en el mecanismo de reacción. El aumento de la velocidad de consumo del nucleótido al eliminar el $O_2^{\bullet-}$ resulta contradictorio ya que si se supone que el mismo participa como intermediario reactivo en el proceso, debería observarse una velocidad menor de consumo de dAMP al realizar el experimento en presencia de un secuestrador (SOD) de dicha especie, y por el contrario, los resultados obtenidos muestran que de alguna manera, el $O_2^{\bullet-}$ inhibe el proceso fotosensibilizado; comportamiento que ya fue observado para el sistema Ptr-dAMP.² Para poder explicar este comportamiento debe considerarse el mecanismo completo del proceso. Por ello se volverá sobre este punto en la siguiente sección donde se discutirá en detalle el modelo.

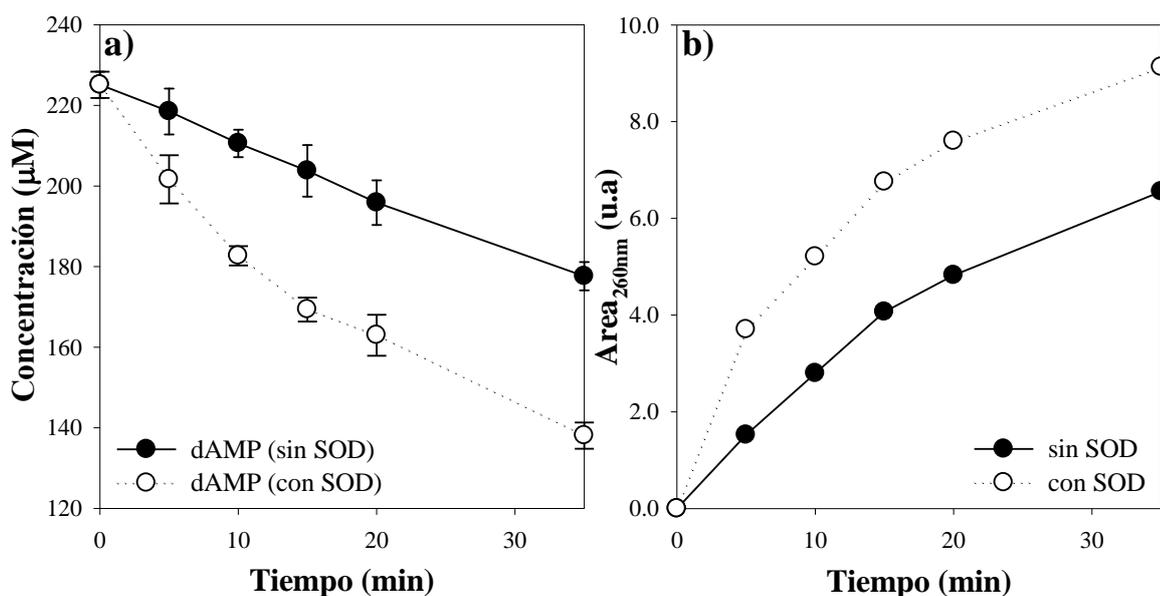


Figura 11.13: a) Evolución de la concentración de dAMP en mezclas de Lum y dAMP en función del tiempo de irradiación en ausencia y presencia de SOD (340 U / ml). b) Evolución del área a 260 nm del producto obtenido por HPLC. Equipo: HPLC-1; Fase móvil: Sistema III. pH = 5,5; $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$; $[\text{dAMP}]_0 = 225 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{Lum}]_0 = 155 \text{ } \mu\text{M}$.

11.6.2 Experimentos de EPR

Se llevaron a cabo experimentos de EPR, con el objeto de corroborar que en el proceso fotosensibilizado se genera $\text{O}_2^{\cdot-}$. Para ello se utilizó la técnica descrita en la Sección 7.4, para demostrar la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en soluciones de Lum y dAMP bajo irradiación.

Se irradiaron soluciones de Lum y dAMP en presencia de un secuestrador de spin, el 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) y se tomaron espectros a distintos tiempos de irradiación. En los mismos se observó la generación de una señal que fue creciendo con el tiempo de irradiación, alcanzando un valor máximo a los cuatro minutos (Figura 11.14g). Al analizar las señales, las constantes de acoplamiento indican la presencia del aducto $\text{DMPO}^{\cdot}\text{-OOH}$.⁶ Este resultado sugiere que DMPO ha atrapado $\text{O}_2^{\cdot-}$ presente en el medio y que la cantidad del mismo aumenta con el tiempo de irradiación. Se hicieron controles con soluciones de dAMP en ausencia de Lum y, como era de esperar, no se observó ninguna señal que correspondiera al aducto, lo cual corrobora que el aducto se forma como consecuencia de un proceso fotoquímico.

Las señales obtenidas para las soluciones conteniendo Lum y dAMP se compararon con aquellas obtenidas en exactamente las mismas condiciones experimentales, pero en

ausencia del nucleótido. Estas señales, descritas en detalle en la Sección 10.4.2 se muestran comparativamente en la Figura 11.14. Para los diferentes tiempos de irradiación, las señales correspondientes al aducto obtenidas en presencia dAMP fueron más intensas que las registradas en su ausencia (Figura 11.14a-d). Para confirmar la participación del $O_2^{\cdot-}$ en la formación del aducto DMPO \cdot -OOH, se realizaron experimentos similares en presencia de SOD (Sección 7.4.4). Como se muestra en la Figura 11.14h el agregado de esta enzima causa una importante disminución de la señal de EPR. Por lo tanto, se puede concluir que al irradiar soluciones de Lum y dAMP se genera $O_2^{\cdot-}$.

En base a la comparación de los resultados aquí presentados con los ya mencionados en el capítulo anterior, se puede concluir que Lum por sí sola es capaz de generar $O_2^{\cdot-}$, pero la diferencia observada en la magnitud de las señales con y sin dAMP corresponde a $O_2^{\cdot-}$ generado como consecuencia del proceso fotosensibilizado.

11.7 Participación del estado excitado triplete de Lumazina

Los resultados mostrados en las secciones precedentes, sugieren que la fotosensibilización de dAMP por Lum ocurre a través de un mecanismo Tipo I, desencadenado por el estado triplete de Lum ($^3Lum^*$). Sin embargo, aún no se han presentado resultados que revelen de forma unívoca la participación de este estado excitado en el proceso estudiado. Con el objeto de confirmar esta hipótesis se realizaron dos grupos de experimentos, cuyos resultados se exponen en esta sección: fotólisis estacionaria en presencia de yoduro de potasio y estudios mediante experimentos resueltos en el tiempo.

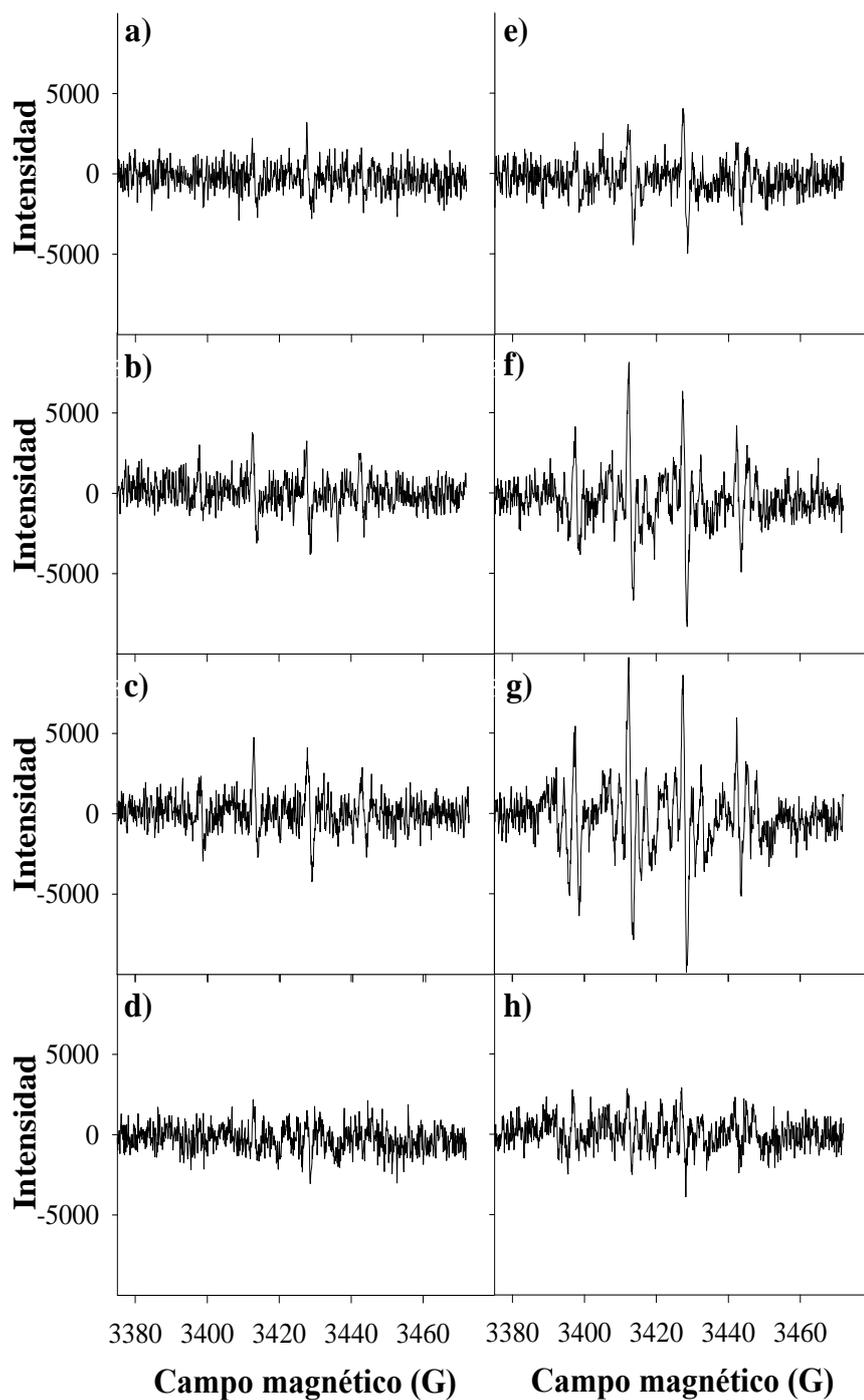


Figura 11.14: Detección del aducto DMPO-OOH por análisis de EPR en soluciones acuosas de Lum y DMPO. En ausencia (a-d) y en presencia (e-h) de dAMP. (a, e) luego de 40 s; (b, f) luego de 3 min; (c, g) luego de 4 min de irradiación, y (d, h) equivalente a (c, g) con el agregado de SOD (22 U / ml). [Lum] = 100 μ M; [DMPO] = 50 mM y [dAMP] = 200 μ M. pH = 7,0.

11.7.1 Fotólisis estacionaria en presencia de yoduro de potasio

Teniendo en cuenta el estudio presentado en la Sección 9.4, se trabajó con concentraciones de I⁻ de manera de desactivar el estado triplete (³Lum^{*}) sin afectar el estado singlete de Lum (¹Lum^{*}). Para ello se prepararon soluciones conteniendo Lum y dAMP, y se realizaron experimentos comparativos en ausencia y en presencia de KI = 200 μM. Los resultados revelan que en presencia de I⁻ y bajo las concentraciones usadas, la velocidad de consumo del nucleótido decrece notablemente comparada con la obtenida en ausencia del mismo (Figura 11.15). Estos resultados refuerzan la hipótesis que es el ³Lum^{*} el que participa en los primeros pasos del proceso fotosensibilizado. Los mismos se corresponden perfectamente con los resultados presentados en la Figura 11.11, en la cual el consumo de dAMP se vió significativamente disminuido en presencia de un desactivador del estado excitado triplete como lo es el O₂.

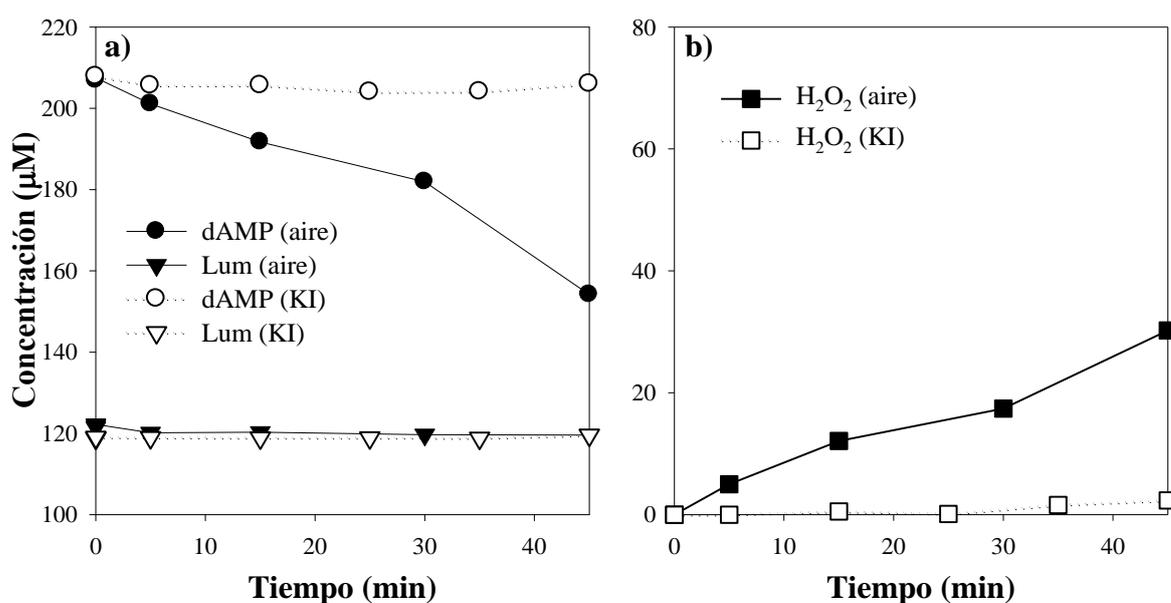


Figura 11.15: Evolución de la concentración de dAMP, Lum y H₂O₂ en función del tiempo de irradiación. Soluciones en aire en ausencia y presencia de KI (200 μM); λ_{exc} = 300 nm; [Lum]₀ = 120 μM, [dAMP]₀ = 210 μM; pH = 5,5.

11.7.2 Desactivación del estado excitado triplete de Lumazina por dAMP

Los resultados presentados hasta aquí sugieren que ³Lum^{*} juega un papel clave en la oxidación fotosensibilizada de dAMP. Sin embargo, la evidencia directa de la interacción entre el ³Lum^{*} y el estado fundamental de dAMP aún no se ha evidenciado.

Con este objetivo, se realizaron estudios de desactivación mediante experimentos resueltos en el tiempo.

Para determinar la desactivación del triplete por dAMP en medio ácido, tal como se detalló en el Capítulo 7, los experimentos se llevaron a cabo mediante medidas de $^1\text{O}_2$ en D_2O . Se prepararon soluciones de Lum, a $\text{pD} = 5,5$ y se agregaron cantidades crecientes de dAMP. Las mezclas se irradiaron con un pulso de láser a 309 nm y para cada concentración de dAMP agregada se registró una señal. Las señales obtenidas a 1270 nm, siguieron un comportamiento biexponencial, de las cuales según el análisis detallado en el Capítulo 9 se pudo obtener el tiempo de vida del triplete de Lum (τ_T) como así también el del $^1\text{O}_2$ (τ_Δ). En el sistema utilizado, ambos parámetros (τ_Δ y τ_T) pueden ser modificados por la concentración de dAMP; por lo tanto, las señales se registraron en diferentes escalas de tiempo. Con las ventanas de tiempo mayores a 100 μs se calculó τ_Δ para cada concentración de dAMP mediante análisis monoexponencial ($I = A_1 e^{-t/\tau_\Delta}$). A continuación, cada valor de τ_Δ se reemplazó en la ecuación 3, descripta también en el Capítulo 7, y se calculó τ_T para cada concentración de dAMP.

$$I = A_1 e^{-t/\tau_\Delta} - A_2 e^{-t/\tau_T} \quad (3)$$

Este análisis se hizo sobre las señales tomadas en ventanas de tiempo más corto $\sim 50 \mu\text{s}$. En ausencia de desactivador (dAMP), el valor de τ_T^0 encontrado fue $1,6 \pm 0,3 \mu\text{s}$. Con los valores de τ_T obtenidos para cada concentración de dAMP se realizó un análisis Stern-Volmer para determinar la constante bimolecular de desactivación k_q^{dAMP} (Ecuación 4).

$$\tau_T^0/\tau_T = 1 + k_q^{\text{dAMP}} \tau_T^0 [\text{dAMP}] \quad (4)$$

donde τ_T^0 y τ_T son el tiempo de vida del $^3\text{Lum}^*$ en ausencia y en presencia del desactivador, respectivamente. Es importante mencionar que en este caso, cuando se habla de τ_T^0 , se trata del tiempo de vida del $^3\text{Lum}^*$ en aire. El valor de k_q^{dAMP} obtenido de la pendiente del gráfico de Stern-Volmer fue $(6 \pm 2) 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este resultado proporciona evidencia directa de la interacción del $^3\text{Lum}^*$ con dAMP en medio ácido.

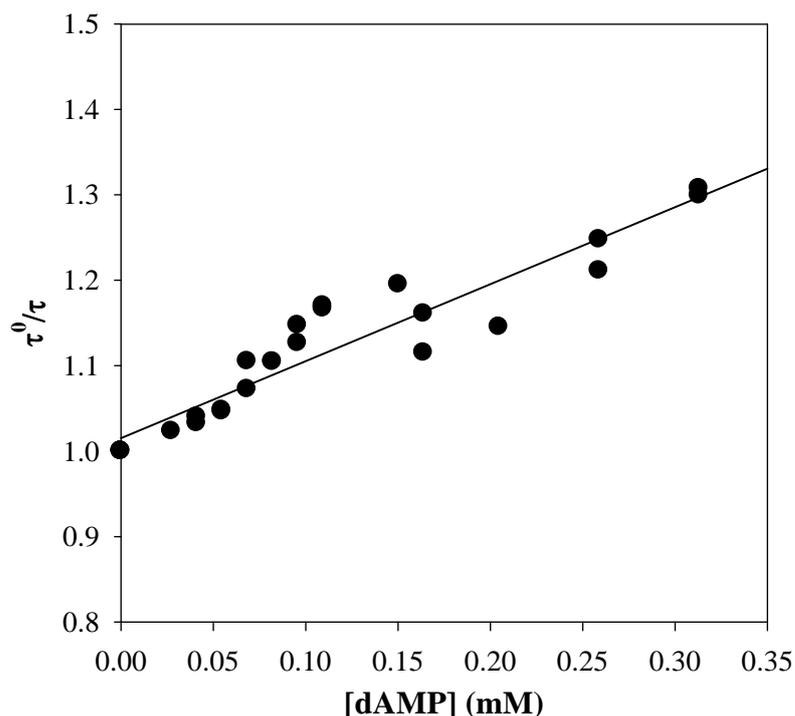


Figura 11.15: Experimentos de $^1\text{O}_2$. Análisis Stern-Volmer. Desactivación del $^3\text{Lum}^*$ por dAMP. pD = 5,5. $\lambda_{\text{exc}} = 309$ nm.

Tal como se describió en el Capítulo 7, para los experimentos de desactivación del $^3\text{Lum}^*$ en medio alcalino, se prepararon mezclas acuosas de Lum y dAMP (en atmósfera de N_2), se las irradió con $\lambda = 355$ nm proveniente de un láser de Nd-YAG y se evaluó la magnitud de ambos tiempos de vida con el incremento de la concentración de nucleótido mediante un análisis de Stern-Volmer (Figura 11.16). De dicho análisis se desprende que ni el tiempo de vida asignado al triplete de Lum, ni el tiempo de vida más largo sufrieron cambios significativos al agregar dAMP; por lo que se puede concluir que dentro de las concentraciones usadas, no hay desactivación evidente del $^3\text{Lum}^*$ por dAMP a pH alcalino.

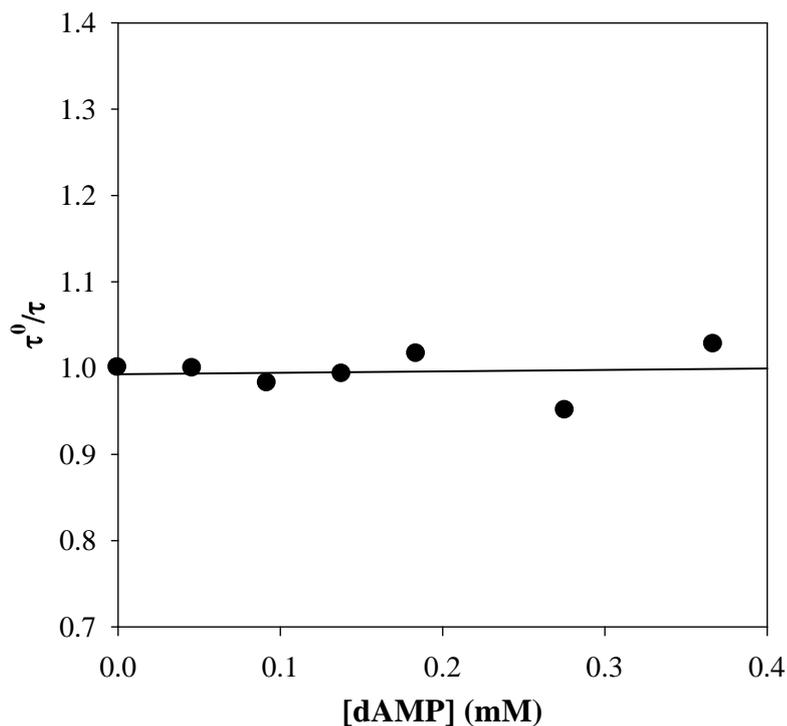


Figura 11.16: Experimentos de fotólisis de destello láser. Análisis Stern-Volmer. Desactivación del $^3Lum^*$ por dAMP. pH = 10,5. $\lambda = 355$ nm.

Los resultados hasta aquí mostrados indican que la desactivación en medio ácido de $^3Lum^*$ por dAMP es mucho más eficiente que en medio alcalino. Esta diferencia, reflejada en los valores de k_q^{dAMP} puede deberse a la diferencia en la carga entre las dos formas ácido-base de Lum. Si la desactivación de $^3Lum^*$ implica un mecanismo de transferencia de carga, el estado excitado de la forma alcalina será un aceptor de electrones menos eficiente por ser una molécula cargada negativamente.

11.8 Investigación de productos por la técnica HPLC acoplada a espectrometría de masa por ionización *electrospray*

Con el objeto de determinar los productos de la reacción fotosensibilizada, se decidió realizar un estudio de los mismos empleando la técnica HPLC, acoplada a espectrometría de masa por ionización *electrospray* (HPLC-ESI-MS) (Capítulo 6).

En este estudio se registraron y compararon los cromatogramas obtenidos con el HPLC tanto en soluciones irradiadas como no irradiadas de dAMP y Lum. El análisis se realizó en modo iónico positivo y negativo (ESI^+ y ESI^- , respectivamente).

La Figura 11.17 muestra los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras de Lum y dAMP sin irradiar e irradiadas 45 y 120 min, en condiciones de pH ácido. La Figura 11.17a, correspondiente a la muestra sin irradiar, muestra dos picos, a $t_r = 2,20$ min y $t_r = 3,40$ min, los cuales son asignados teniendo en cuenta los análisis previos (Sección 11.2) a dAMP y Lum, respectivamente. Nótese que los t_r difieren de aquellos registrados en los cromatogramas realizados con el equipo HPLC-1, lo cual es lógico dado que el equipo, la columna, y el solvente de corrida son diferentes.

En los insertos de la Figura 11.17a se muestra el análisis mediante espectrometría de masas por ionización electrospray en modo iónico positivo (ESI⁺) de los picos observados en el HPLC. En el pico de $t_r = 2,19$ min se detectó el ion molecular intacto de dAMP ($[M+H]^+ = [dAMP+H]^+$) a m/z 332,2 Da y en el pico de $t_r = 3,40$ min se detectó el ion molecular de Lum ($[Lum+H]^+$) ($m/z=165,2$ Da), su aducto de Na ($[Lum+Na]^+$) a m/z 187,2 Da, y un tercer pico de $m/z = 182,1$ que correspondería a Lum hidratada ($[Lum+H_2O]^+$).

En las Figuras 11.17b y 11.17c, se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras de Lum y dAMP irradiadas 45 y 120 min, respectivamente. Si se comparan estas figuras con la Figura 11.17a, se puede observar la aparición de dos picos adicionales P_1 y P_2 , los cuales podrían ser asignados a los productos de la reacción fotosensibilizada. Al analizar los espectros de masas de los picos obtenidos en el HPLC de las soluciones irradiadas, tanto 45 min como 120 min, se observaron las mismas señales que en las muestras no irradiadas, como así también señales a m/z 330,2 Da, 348,2 Da, y a 370 Da (Figura 11.18 y Figura 11.19), las cuales corresponderían a los productos P_1 y P_2 . Vale la pena aclarar, que la señal a m/z 332,2 está presente en el espectro de este pico, debido a que el mismo comienza a eluir, aún cuando el pico correspondiente a dAMP de $t_r = 2,20$ min, no ha terminado de hacerlo.

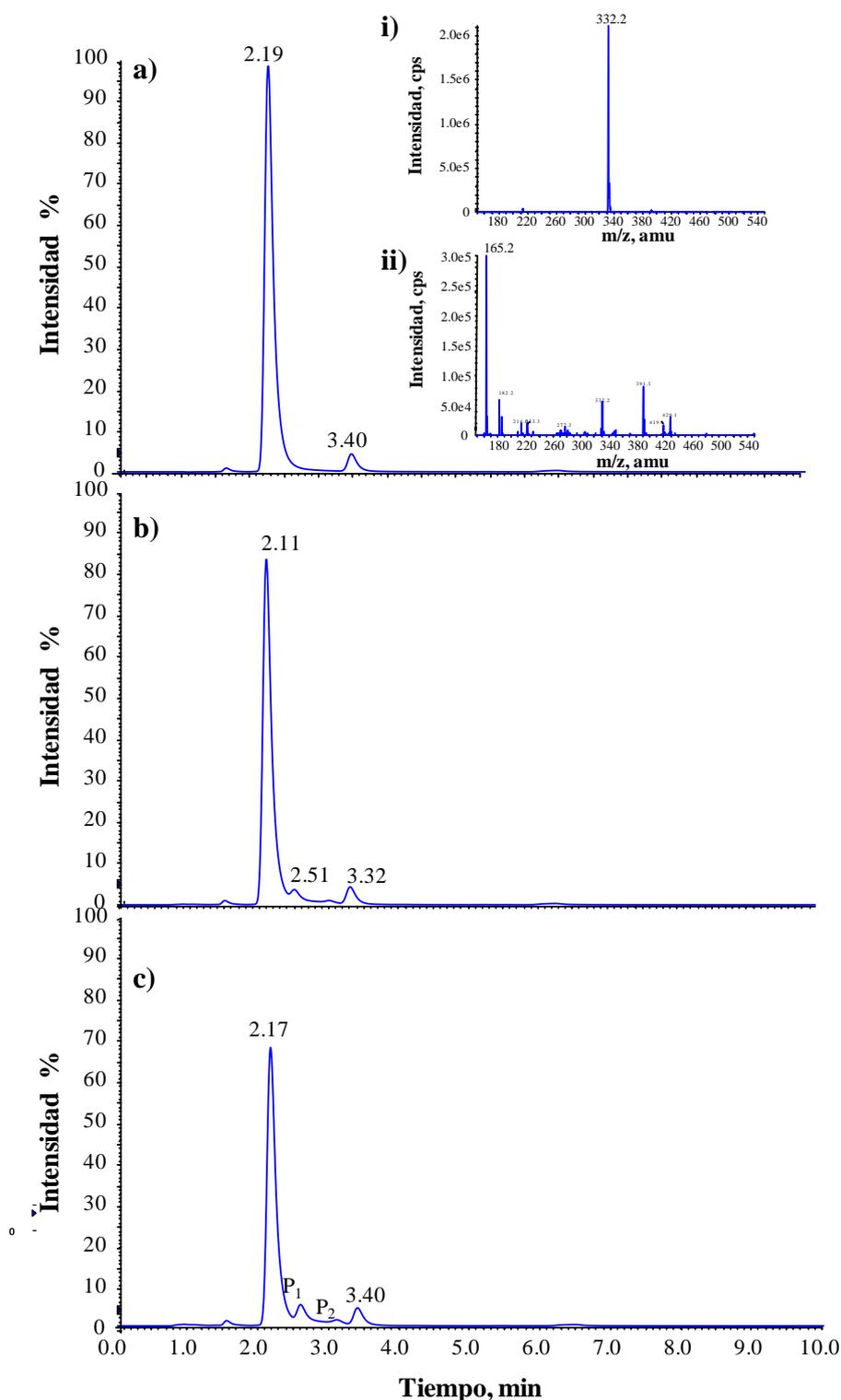


Figura 11.17 Cromatogramas registrados para una solución de Lum y dAMP. $[Lum]_0 = 140 \mu M$ y $[dAMP]_0 = 230 \mu M$. a) Sin irradiar, b) Irradiada 45 min y c) Irradiada 120 min. $\lambda_{exc} = 312 \text{ nm}$; $\lambda_{análisis} = 260 \text{ nm}$. Equipo: HPLC 2; Fase móvil: Sistema IV. *Inserto*: ESI-MS (análisis en modo positivo a 30 V) de soluciones sin irradiar. Espectro de masa correspondiente al pico de (i) $t_r = 2,19 \text{ min}$ y (ii) $t_r = 3,40 \text{ min}$.

Es interesante destacar que uno de los productos (P_2) tiene una masa que difiere en 16 de la masa de dAMP (348,2 Da). Este hecho sugiere que dicho producto podría formarse por la incorporación de un átomo de oxígeno a la estructura del nucleótido. Las señales de $m/z = 348,2$ y 370 Da seguramente corresponden al mismo producto, siendo el primero el ión molecular y el segundo su aducto de Na. En las figuras se puede observar que, como era de esperar, los picos con $m/z = 330,2$ Da y $m/z = 348,2$ Da aumentan al aumentar el tiempo de irradiación.

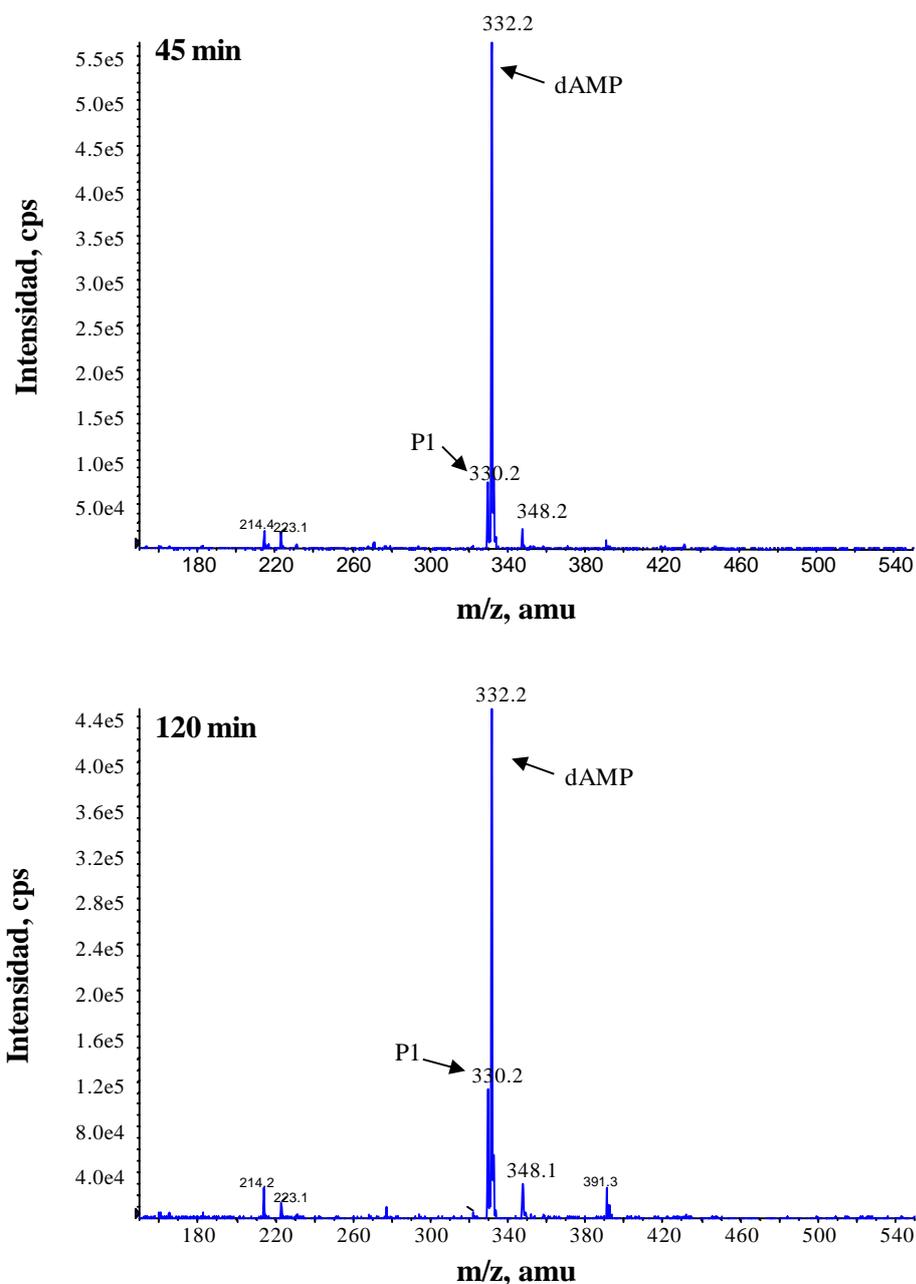


Figura 11.18: Espectros de masa por ionización *electrospray* del pico correspondiente a P_1 ($t_r = 2,60$ min). Soluciones irradiadas 45 y 120 min. Análisis en modo positivo a 30 V.

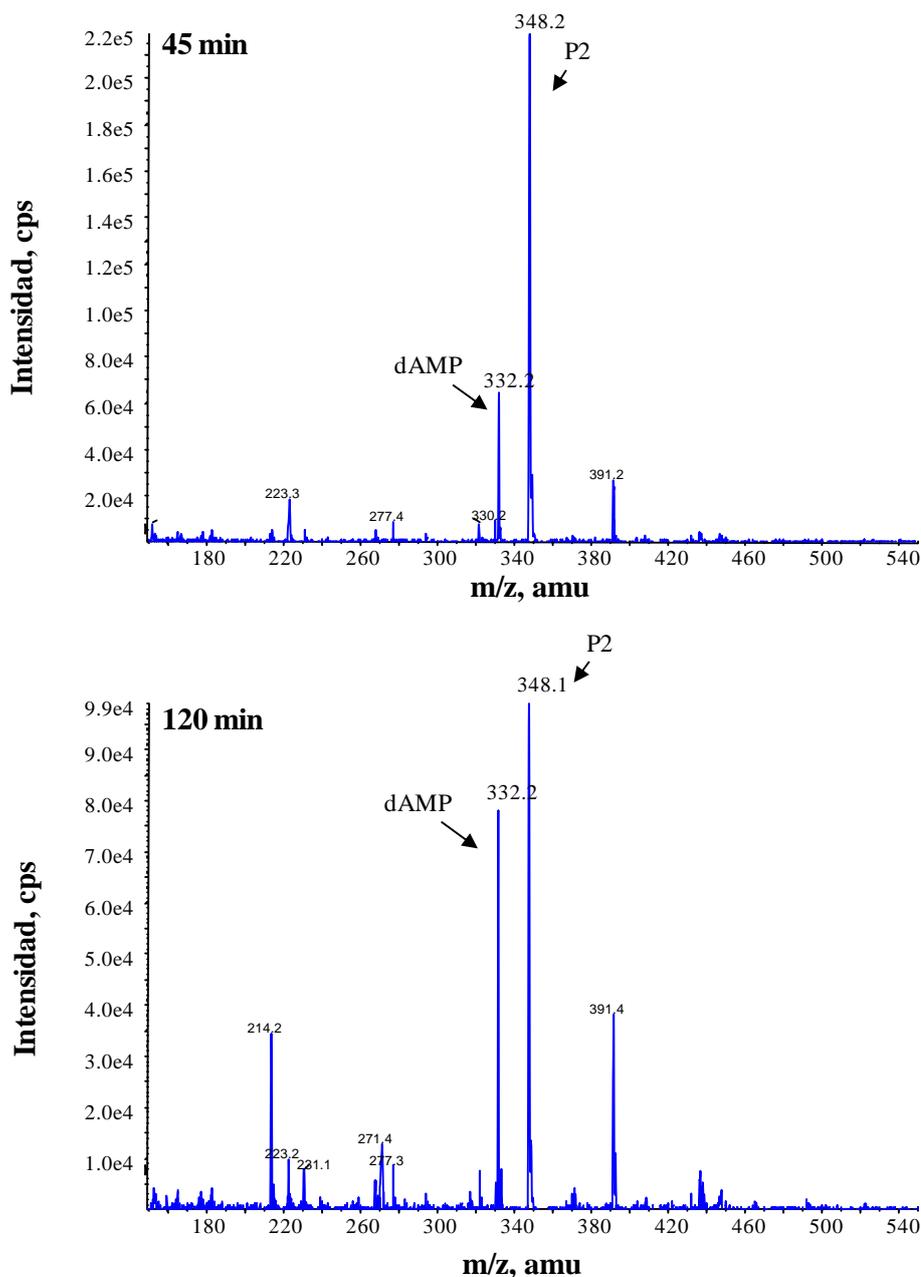


Figura 11.19: Espectros de masa por ionización *electrospray* del pico correspondiente a P₂ (t_r = 3,30 min). Soluciones irradiadas 45 y 120 min. Análisis en modo positivo a 30 V.

Empleando el modo ESI⁻ se realizó un análisis similar al expuesto en los párrafos anteriores para ESI⁺. Se analizaron los dos picos presentes en las soluciones sin irradiar. En el pico de t_r = 2,19 min se detectó el ion molecular intacto de dAMP ([M-H]⁻ = [dAMP(-H)]⁻) a m/z 329,9 Da, y en el de t_r = 3,40 min se detectó el ión molecular de Lum ([Lum (-H)]⁻) a (m/z = 163,1 Da).

En los espectros de masas de los picos obtenidos en los cromatogramas de las soluciones irradiadas se observaron las mismas señales que en las muestras no irradiadas, pero también señales a m/z 328,1 y 346 (en P_1 y P_2 respectivamente).

Considerando detenidamente el conjunto de los espectros obtenidos haciendo el análisis en ambos modos de ionización (Tabla 11.1) queda claro que durante la irradiación de las muestras se generaron al menos dos productos (los que fueron llamados arbitrariamente P_1 y P_2). El peso molecular de P_1 es 329 (señales a m/z 328,1 y 330,2 en modos ESI^- y ESI^+ , respectivamente), mientras el peso molecular del P_2 es 347 (señales a m/z 346 y 348,2 en modos ESI^- y ESI^+ , respectivamente).

Compuesto		m/z (Da) Modo Pos.	m/z (Da) Modo Neg.
dAMP	Ión molecular	332,2	329,9
P_1	Ión molecular	330,2	328,1
P_2	Ión molecular	348,2	346
	Aducto con Na	370	---

Tabla 11.1: Valores de m/z en modo positivo y negativo para reactivos y productos.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, y lo ya visto en experimentos realizados con pterina², el producto P_2 podría ser 8-oxo-dAMP cuyo peso molecular es 347 Da, y P_1 probablemente sea 8-P-dAMP tetracíclico ya que se corresponde con el peso molecular 329 Da, aunque es difícil especular sobre la naturaleza química de este producto (Figura 11.20).

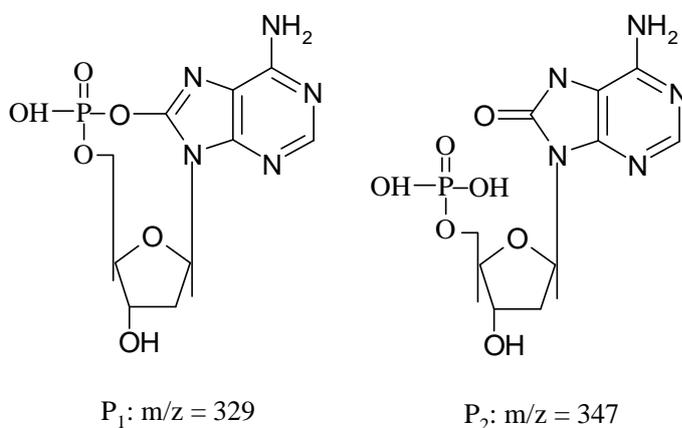


Figura 11.20: Estructuras químicas propuestas para los productos P_1 ($M = 329$) y P_2 ($M = 347$).

La identificación de 8-oxo-dAMP como producto de oxidación fotosensibilizada de dAMP es importante ya que 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiadenosina (8-oxo-dAdo) ha sido propuesto como producto de la oxidación fotosensibilizada de 2'-desoxiadenosina (dAdo) en DNA *via* un mecanismo Tipo I.⁷ Además, se ha publicado que la conversión del radical catión de dAdo a 8-oxo-dAdo es eficiente.⁸ Es decir, es un punto a favor de la hipótesis de que la reacción de sensibilización de dAMP por Lum ocurre por transferencia de electrones (mecanismo Tipo I) Además, como ya se mencionó en el Capítulo 2, el radical dAMP⁺ produce 8-oxo-dAMP.⁹

Se realizaron experimentos similares a los mencionados en la sección anterior, pero a pH alcalino. Se obtuvieron los cromatogramas de las muestras sin irradiar e irradiadas 120 min. En ambos cromatogramas se observaron solo dos picos; los cuales fueron asignados según sus t_r a Lum y dAMP. Tal como se describió en las secciones anteriores, en medio alcalino no ocurre fotosensibilización de dAMP por Lum, lo cual concuerda con estos resultados, ya que no se distinguen diferencias entre los cromatogramas provenientes de ambas condiciones de irradiación.

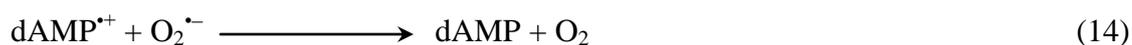
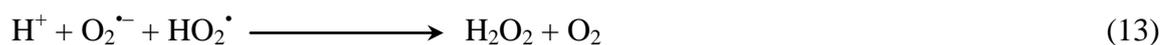
Con el objeto de corroborar esta hipótesis, se obtuvieron los espectros de masa a distintos tiempos de retención, en donde se prestó particular atención a la región del cromatograma correspondiente a los productos observados en medio ácido, en todos los casos se observaron señales débiles, con picos correspondientes al nucleótido y al sensibilizador.

Los resultados obtenidos permiten asegurar que al irradiar durante 120 min soluciones alcalinas de Lum y dAMP, no hay formación de productos, ni consumo de reactivos, lo cual confirma que no hay oxidación fotosensibilizada.

11.9 Mecanismo de reacción

Se ha demostrado a lo largo de este capítulo que durante la irradiación de soluciones acuosas aireadas conteniendo Lum y dAMP a pH = 5,5 se consume dAMP y O₂, la concentración de Lum permanece constante y se produce H₂O₂. Además, se probó que el O₂^{•-} se forma y participa en el mecanismo como inhibidor del consumo de dAMP. Por otro lado se descartó la participación del ¹O₂. Los resultados presentados hasta aquí permiten proponer un mecanismo de reacción (Esquema 11.1). Aquí solo se detallan las reacciones específicas del proceso fotosensibilizado, para contar con el mecanismo

completo, a éstas se les deberían agregar las reacciones detalladas en la Sección 10.5 del capítulo anterior.



Esquema 11.1: Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de sensibilización de dAMP por Lum en medio ácido.

Luego de la excitación de Lum, y la formación de su estado triplete excitado ${}^3\text{Lum}^*$ (Reacciones 5 y 6), compiten varias reacciones para la desactivación de este último: entrecruzamiento de sistemas al estado singlete basal (Reacción 7), transferencia de energía al oxígeno molecular para la formación de ${}^1\text{O}_2$ y regeneración de Lum (Reacción 8), y por último una transferencia de electrones entre dAMP y ${}^3\text{Lum}^*$ que conduce a la formación de los iones radicales $\text{Lum}^{\bullet-}$ y $\text{dAMP}^{\bullet+}$ (Reacción 9). En experimentos llevados a cabo en aire, la velocidad de esta última reacción es significativa, y se observa un importante consumo de dAMP. En contraste, cuando el experimento se realiza en atmósfera saturada de oxígeno, la Reacción 8 es la dominante, por lo que la proporción de ${}^3\text{Lum}^*$ que reacciona con el nucleótido es mucho menor y consecuentemente la velocidad de consumo de dAMP es mucho más lenta.

En el paso siguiente, los iones radicales se pueden recombinar (Reacción 10), lo cual explica que no haya consumo de nucleótido en condiciones de anaerobiosis.

Alternativamente, puede producirse una transferencia de electrones desde Lum^{•-} al O₂ para regenerar Lum y formar O₂^{•-} (Reacción 11). Este radical mediante una reacción de desproporción con su ácido conjugado HO₂[•] genera H₂O₂ (Reacción 12 y 13) o reacciona con dAMP⁺ para regenerar dAMP (Reacción 14). Esta última reacción se acelera en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), por lo que el O₂^{•-} se elimina más rápidamente, y en consecuencia se incrementa la oxidación fotosensibilizada del nucleótido. Finalmente los procesos indicados en la Reacción 15 explican la oxidación de dAMP y el consumo neto de O₂.

11.10 Referencias

- 1 J.-L. Ravanat, R. Martinez, M. H. G. Medeiros, P. Di Mascio, J. Cadet, *Arch. Biochem Biophys.*, **2004**, 423, 23-30
- 2 G. Petroselli, R. Erra-Balsells, F. M. Cabrerizo, C. Lorente, A. L. Capparelli, A. M. Braun, E. Oliveros, A. H. Thomas, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 2792–2799
- 3 J.-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2001**, 63, 88-102
- 4 M. J. Cavaluzzi, P. N. Borer, *Nucleic Acid Res.*, **2004**, 32(1), e13
- 5 F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1995**, 24, 663-1021
- 6 E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**, 200, 1-16.
- 7 T. Douki, J. Cadet, *Int. J. Radiat. Biol.*, **1999**, 75, 571-581
- 8 D. Angelov, A. Spassky, M. Berger, J. Cadet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11373-11380
- 9 C. Burrows, *Chem Rev.*, **1998**, 98, 1109-1151

Capítulo 12

Fotosensibilización de 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato por Lumazina

Como se explicó anteriormente en el Capítulo 2, la base nitrogenada guanina es el principal blanco de las oxidaciones fotosensibilizadas.¹ Su menor potencial de oxidación, respecto de las otras bases, la hace el componente del ADN más sensible a fotooxidaciones, tanto por mecanismos Tipo I como Tipo II, a diferencia de dAMP que no es sensible a fotooxidaciones por mecanismos Tipo II. Por su parte, lumazina (Lum) en solución acuosa bajo irradiación UV es un buen generador de $^1\text{O}_2$ (Capítulo 10) y en el Capítulo 11 se demostró que también puede actuar como fotosensibilizador mediante un mecanismo Tipo I. Por consiguiente, el objetivo principal de este capítulo al estudiar la fotooxidación de dGMP sensibilizada por Lum, es evaluar la contribución de los dos posibles mecanismos.

En este capítulo se presentan resultados de experimentos en los cuales se irradiaron soluciones acuosas conteniendo Lum y dGMP a pH 5,5 y 10,5, con el objeto de evitar interferencias entre las dos formas ácido-base del sensibilizador. Debido a la dependencia de los espectros de absorción de Lum con el pH, las soluciones se irradiaron a distintas longitudes de onda: las ácidas con lámparas Rayonet RPR3000 con el filtro de corte ya mencionado en el Capítulo 5, y las soluciones alcalinas con lámparas Rayonet RPR3500. En estas condiciones de irradiación, Lum es el único compuesto que absorbe radiación (Figura 12.1).

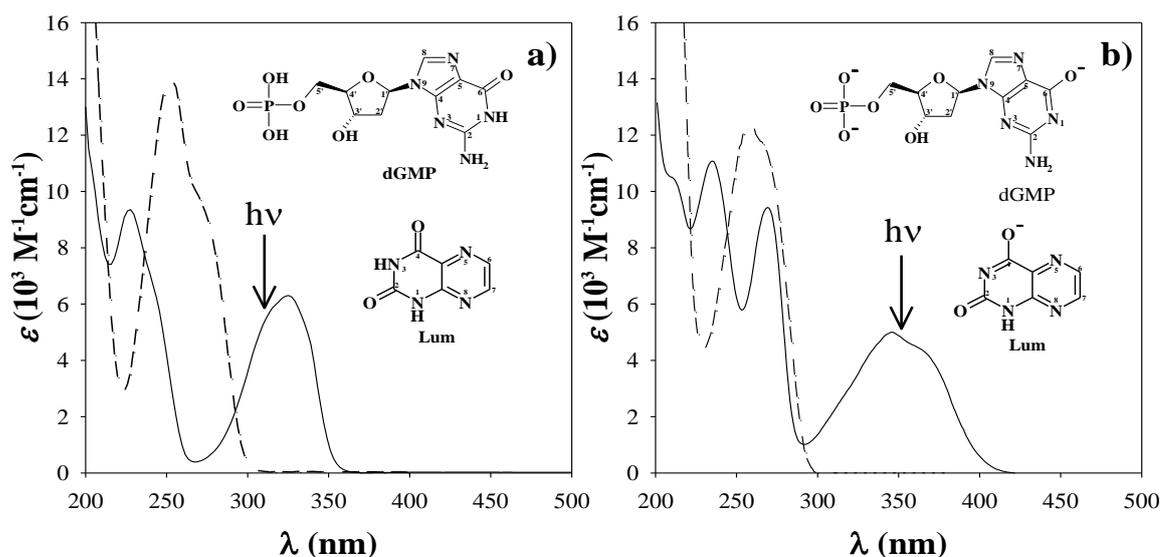


Figura 12.1: Estructuras químicas y espectros de absorción de dGMP y Lum. a) pH = 5,5. b) pH = 10,5. Lum: líneas continuas, dGMP: líneas discontinuas.

12.1 Análisis espectroscópico

En la Figura 12.2a se muestran los cambios espectrales registrados, al exponer a radiación UV de 300 nm una solución aireada conteniendo Lum y dGMP, a pH = 5,5 durante distintos períodos de tiempo. Puede observarse un decrecimiento de la banda típica de dGMP a 260 nm, y un aumento de la absorción a longitudes de onda mayores a 300 nm y por debajo de 240 nm. Este tipo de cambios espectrales es bastante similar a los registrados para dAMP (Capítulo 11). Por otro lado se realizaron experimentos a diferentes concentraciones de Lum y nucleótido, y en todos los casos se observaron variaciones en los espectros similares a las mostradas en la Figura 12.2a. Dichos cambios espectrales indican inequívocamente que se produce una reacción química. La disminución de la banda a 260 nm sugiere que dGMP se consume y que, por ende, como era esperable, Lum es capaz de fotosensibilizar a dGMP en soluciones ácidas aireadas.

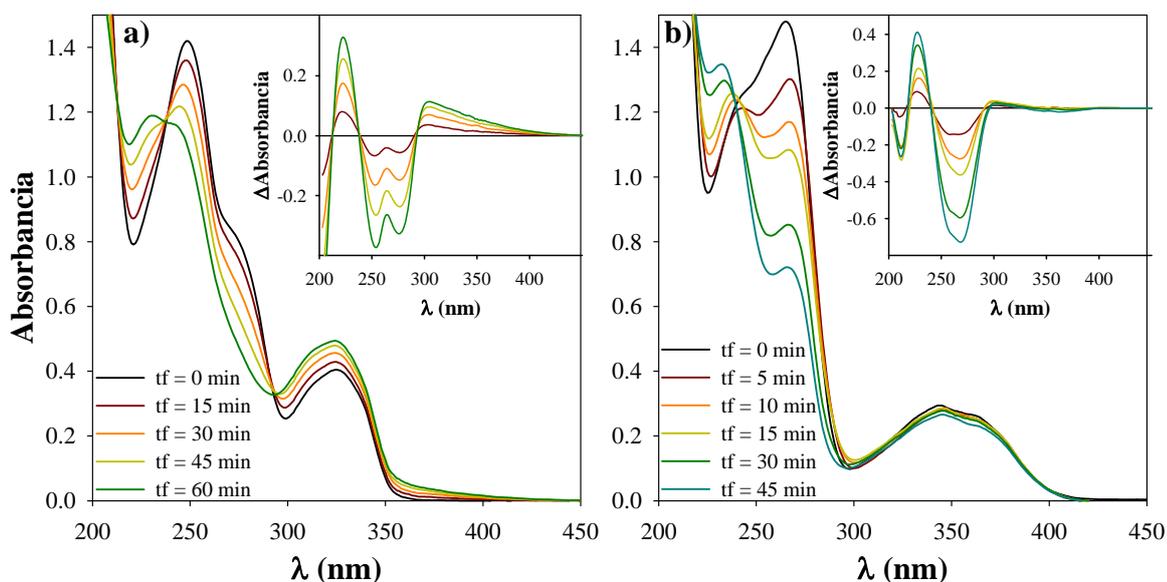


Figura 12.2: Evolución de los espectros de absorción de soluciones acuosas aireadas de Lum y dGMP. Camino óptico = 1 cm; a) pH = 5,5; λ_{exc} = 300 nm; $[Lum]_0$ = 60 μ M y $[dGMP]_0$ = 100 μ M; b) pH = 10,5; λ_{exc} = 350 nm. $[Lum]_0$ = 58 μ M; $[dGMP]_0$ = 95 μ M. Insertos: espectros diferencia.

Los experimentos realizados en medio alcalino (pH = 10,5) también muestran cambios espectrales importantes, con un fuerte decrecimiento en la absorbancia en el rango de longitudes de onda comprendido entre 250-280 nm (Figura 12.2b). En estas condiciones de pH el comportamiento apreciado es completamente distinto al observado usando dAMP

como sustrato, para el cual no se registraron cambios espectrales en medio alcalino (Capítulo 11).

Se llevaron a cabo experimentos de control, para cada pH, similares a los descritos para el estudio de la fotosensibilización de dAMP, para descartar que el consumo de dGMP se deba a reacciones térmicas o a la fotólisis del nucleótido mismo.

Control 1: se registraron los espectros de absorción de soluciones acuosas conteniendo dGMP y Lum conservadas en la oscuridad. Luego de una hora no se observaron cambios espectrales, descartando que ocurra reacción térmica entre dGMP y Lum en ninguna de las dos condiciones de pH, en el período de tiempo analizado.

Control 2: se irradiaron durante una hora soluciones acuosas de dGMP en ausencia de Lum a pH 5,5 y 10,5. No se observaron cambios espectrales. Este resultado es el esperado, dado que el nucleótido no absorbe radiación a las longitudes de onda utilizadas.

Control 3: se irradiaron, también durante una hora, soluciones de Lum (sin nucleótido). Se registraron cambios espectrales despreciables en comparación con los mostrados en la Figura 12.2, lo cual era esperable si se tiene en cuenta que la fotólisis de Lum es un proceso con un rendimiento cuántico muy bajo (Capítulo 10).

12.2 Análisis cromatográfico

Se analizaron por HPLC las muestras irradiadas en presencia de O₂, en ambas condiciones de pH (Figuras 12.3 y 12.4). Bajo las condiciones de análisis empleadas, en las muestras sin irradiar para ambas condiciones de pH, los cromatogramas presentaron dos picos. Teniendo en cuenta los espectros registrados para los dos picos y los t_r obtenidos en cromatogramas de soluciones patrón de Lum y dGMP, el pico de menor tiempo de retención (t_r) corresponde al nucleótido y el de mayor t_r al sensibilizador. Por otro lado, se analizaron por HPLC los tres controles descritos en la sección anterior. En todos los casos se observó que las concentraciones de dGMP o Lum, según corresponda, no variaron durante el tratamiento.

En los experimentos realizados a pH ácido, se observa que a medida que aumenta el tiempo de irradiación, la intensidad del pico correspondiente a dGMP disminuye rápidamente, mientras que para el pico de Lum no se evidencian cambios significativos (Figura 12.3). Además, aparecen nuevos picos, los cuales van aumentando de tamaño a medida que aumenta el tiempo de irradiación. En los insertos de la figura se muestran con

más detalle los primeros minutos de los cromatogramas. Los picos más intensos se observan a t_r 2,4, 2,7 y 3,1 min, y aparece un cuarto pico bastante menor, cuyo t_r es aproximadamente 4,2 minutos.

Empleando otras condiciones de análisis cromatográfico (Capítulo 6) se obtuvieron siempre los mismos resultados: durante la irradiación en medio ácido, el pico de Lum no cambia, dGMP se consume y aparecen varios picos entre el frente del solvente y el pico de dGMP. Este comportamiento confirma que existe un proceso de fotosensibilización en el cual dGMP se consume para generar numerosos productos, mientras que en dicho proceso Lum mantiene su concentración constante.

En las soluciones alcalinas irradiadas, se observa un comportamiento similar al observado para medio ácido. Al aumentar el tiempo de irradiación, la intensidad del pico correspondiente a dGMP disminuye rápidamente, el pico de Lum permanece prácticamente invariable y aparecen nuevos picos, los cuales aumentan su área con el tiempo (Figura 12.4). Estos resultados confirman que, a diferencia de lo observado para dAMP, en medio alcalino también existe un proceso fotosensibilizado en el cual dGMP se consume, mientras Lum se mantiene constante durante el tiempo de irradiación.

Para los cromatogramas obtenidos en los distintos experimentos, se integró el área de cada uno de los picos y se calculó la concentración de ambos reactivos para cada tiempo de irradiación, utilizando las correspondientes curvas de calibración. A modo de ejemplo, en la Figura 12.5 se muestra la evolución de las concentraciones de dGMP y Lum en función del tiempo de irradiación obtenidas en experimentos realizados a pH = 5,5 y pH = 10,5 (Figuras 12.5a y b, respectivamente). En experimentos realizados partiendo de otras concentraciones iniciales, también se observó que la concentración de dGMP disminuye significativamente en función del tiempo de irradiación, mientras que la concentración de Lum permanece constante. A partir de estos resultados se infiere que existe fotosensibilización de dGMP por Lum en ambas condiciones de pH, y que Lum es reciclada durante la reacción.

En lo que respecta a los tres controles descritos en la sección anterior, bajo el análisis por HPLC no se detectó una disminución significativa en la concentración de dGMP.

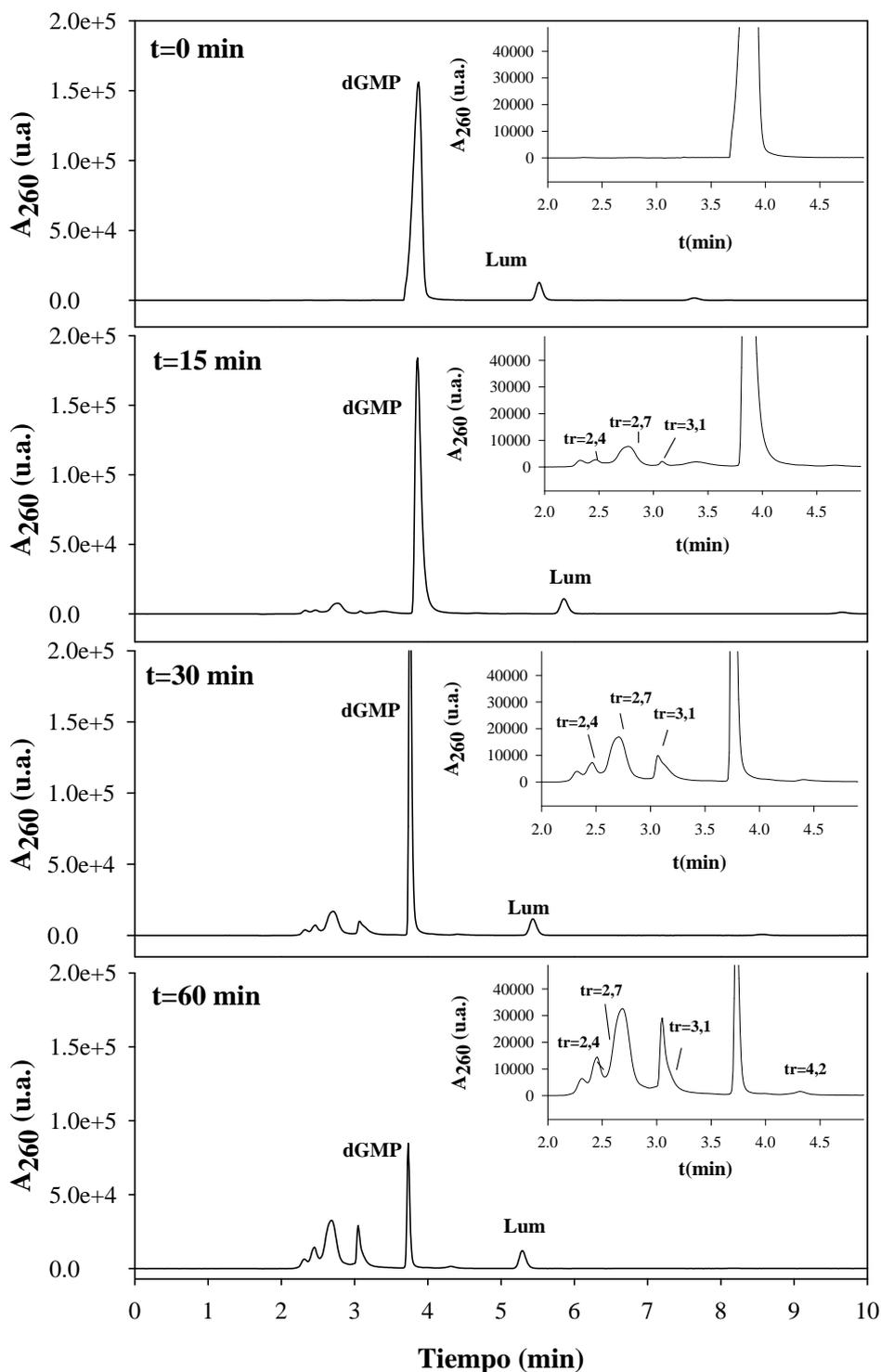


Figura 12.3: Cromatogramas de una solución de dGMP y Lum expuesta a distintos tiempos de irradiación. [dGMP]₀ = 100 μ M; [Lum]₀ = 60 μ M; pH = 5,5. Equipo: HPLC-1; Fase móvil: sistema III; $\lambda_{\text{análisis}}$ = 260 nm.

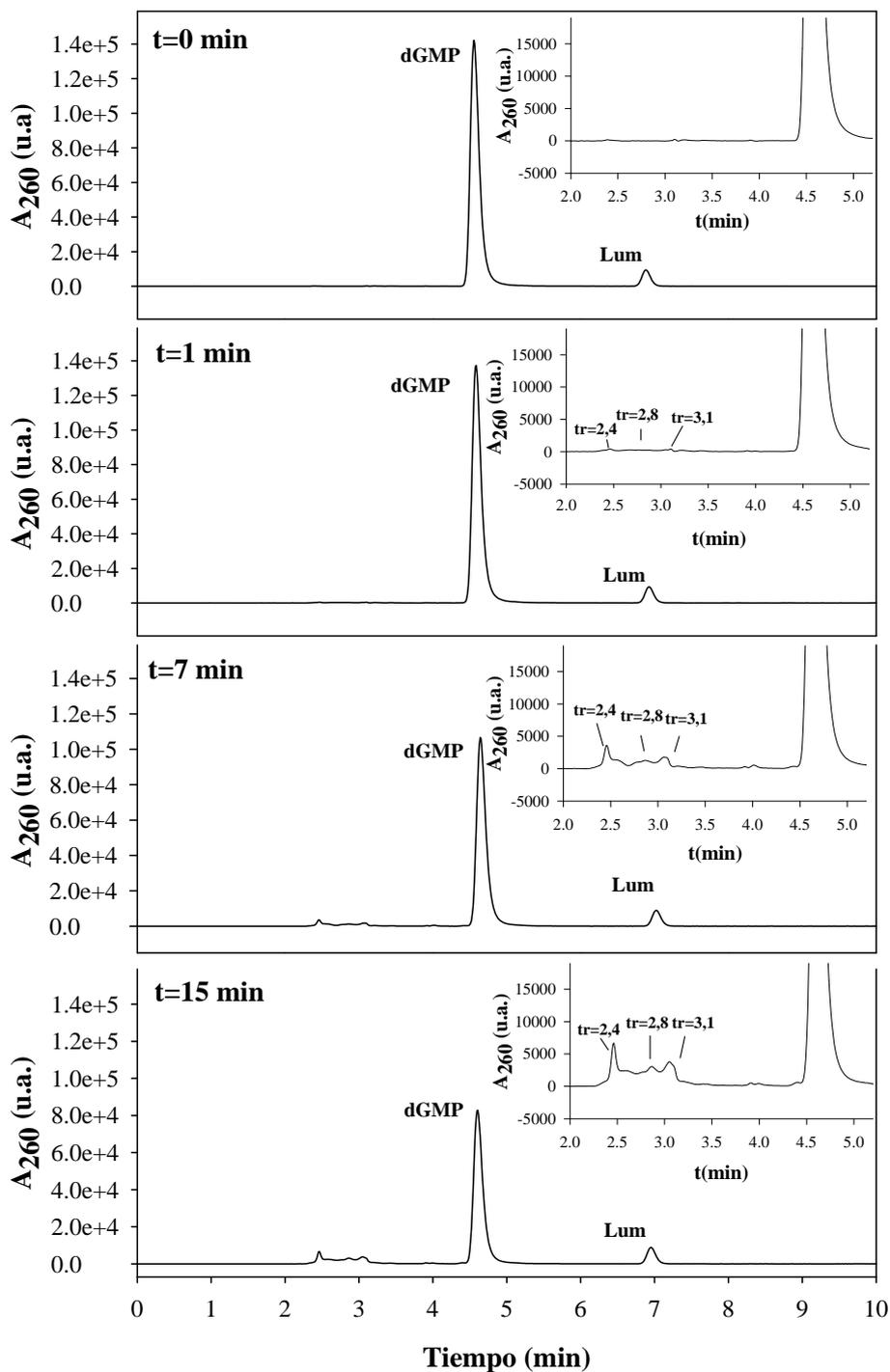


Figura 12.4: Cromatogramas de una solución de dGMP y Lum expuesta a distintos tiempos de irradiación. $[dGMP]_0 = 95 \mu M$; $[Lum]_0 = 58 \mu M$; $pH = 10,5$. Equipo: HPLC-1; Fase móvil: sistema III; $\lambda_{análisis} = 260 \text{ nm}$.

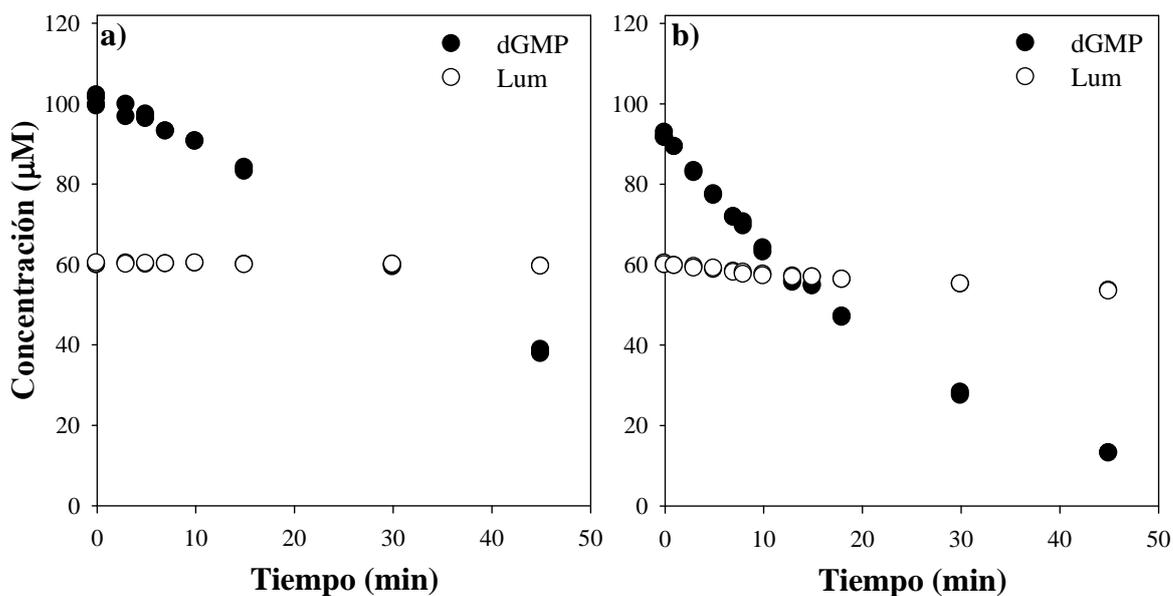


Figura 12.5: Evolución de las concentraciones de Lum y dGMP en función del tiempo de irradiación. a) pH = 5,5; $\lambda_{exc} = 300$ nm; $[Lum]_0 = 60$ μM y $[dGMP]_0 = 100$ μM. b) pH = 10,5; $\lambda_{exc} = 350$ nm. $[Lum]_0 = 58$ μM y $[dGMP]_0 = 95$ μM.

Con el objeto de obtener mayor información sobre los productos generados durante la fotosensibilización de dGMP, se realizó un estudio de los mismos con el equipo HPLC-1 (Capítulo 6), que permite obtener espectros de absorción de los compuestos correspondientes a los distintos picos. Se pudieron obtener los espectros de los productos de fotooxidación tanto en medio ácido como en medio alcalino (Figura 12.6). Todos ellos presentan absorción por encima de 300 nm, lo cual se correlaciona con el aumento de absorbancia en esa zona del espectro observado durante la irradiación (Figura 12.2). Puede observarse que los espectros de absorción de los productos obtenidos en medio ácido son diferentes a los de medio alcalino, indicando que tienen estructuras químicas diferentes.

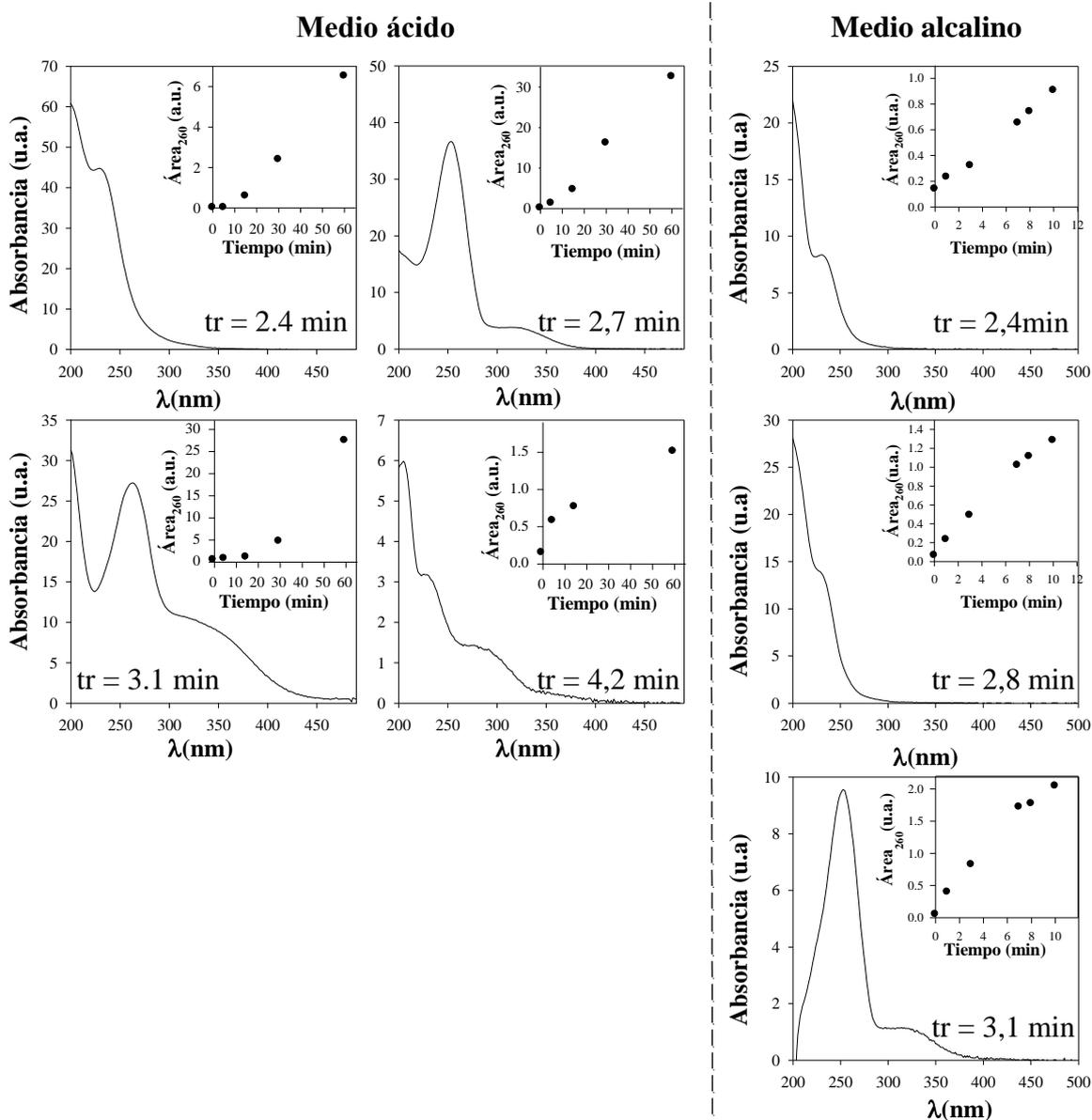


Figura 12.6: Espectros de productos separados por HPLC. Los espectros fueron extraídos de los cromatogramas correspondientes a las muestras irradiadas 60 min (medio ácido) y 15 min (medio alcalino). Insertos: evolución de las áreas en función del tiempo de irradiación. Fase móvil: sistema III. Equipo: HPLC-1.

12.3 Producción de H₂O₂

Se investigó la producción de agua oxigenada (H₂O₂) como producto de la fotosensibilización de dGMP por Lum. El H₂O₂ se detectó y cuantificó en soluciones ácidas y alcalinas irradiadas bajo condiciones aeróbicas. Se realizaron series de experimentos utilizando diferentes concentraciones iniciales de dGMP, mientras la concentración de Lum se mantuvo constante (~ 60 μM). En los experimentos en medio ácido, se observó una significativa formación de H₂O₂, aunque la velocidad de producción

de la misma fue siempre menor a la velocidad de consumo del nucleótido. En medio alcalino, por el contrario, la formación de H_2O_2 , si bien detectable, fue muy baja (Figura 12.7). En ambas condiciones de pH, la producción de H_2O_2 en los tres controles anteriormente mencionados (Lum y dGMP en oscuridad, irradiación de dGMP en ausencia de Lum, e irradiación de Lum en ausencia de dGMP) fue despreciable.

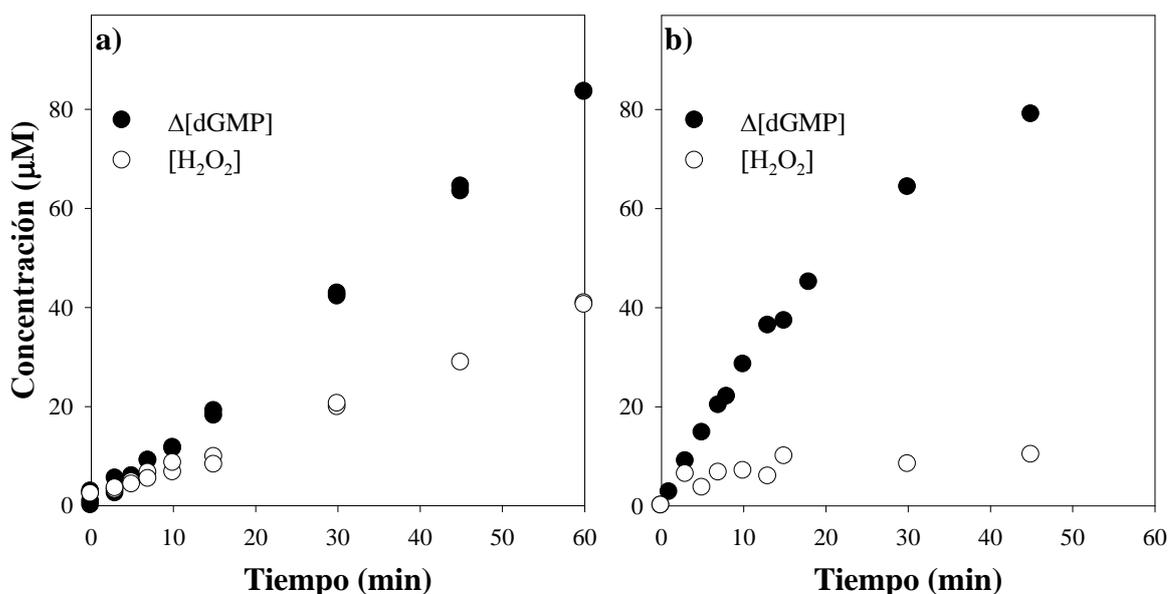


Figura 12.7: Formación de H_2O_2 y consumo de dGMP en soluciones irradiadas de GMP y Lum. Consumo de dGMP: $\Delta[\text{dGMP}] = [\text{dGMP}]_0 - [\text{dGMP}]_t$. a) pH = 5,5, $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$; $[\text{Lum}]_0 = 60 \mu\text{M}$ y $[\text{dGMP}]_0 = 100 \mu\text{M}$. b) pH = 10,5, $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$. $[\text{Lum}]_0 = 58 \mu\text{M}$ y $[\text{dGMP}]_0 = 95 \mu\text{M}$.

Es importante resaltar que el hecho que se produzca H_2O_2 no permite dilucidar si la reacción de fotosensibilización transcurre mediante un mecanismo Tipo I o Tipo II, ya que en ambos casos la formación de H_2O_2 es posible. Por un lado, en las reacciones fotosensibilizadas que transcurren mediante un mecanismo Tipo I, el H_2O_2 se genera a partir del anión superóxido el cual a su vez es generado, generalmente, por una transferencia de electrones desde el sensibilizador al O_2 . Por otro lado, el H_2O_2 puede generarse también durante las reacciones sensibilizadas Tipo II. Esto se debe a que el $^1\text{O}_2$ por reacción con compuestos orgánicos insaturados genera hidroperóxidos² los cuales al descomponerse liberan H_2O_2 .

12.4 Participación del oxígeno

Para evaluar la participación del O₂ en la reacción de sensibilización de dGMP por Lum en medio ácido y alcalino, se realizaron diferentes experimentos: (i) Investigación del consumo de O₂ durante la irradiación de las soluciones; y (ii) Evaluación de la dependencia del consumo de reactivos con la concentración de O₂, para lo cual las irradiaciones de las mezclas se realizaron en atmósferas de Ar y O₂.

12.4.1 Evaluación del consumo de oxígeno

Se determinó la variación de la concentración de O₂ disuelto en función del tiempo de irradiación utilizando un electrodo selectivo (Sección 6.5). En ambas condiciones de pH, la concentración de O₂ decrece como función del tiempo de irradiación (Figura 12.8). Complementariamente se hicieron experimentos control en ausencia de dGMP con el objeto de evaluar qué proporción del consumo de O₂ proviene de la fotólisis de Lum. En ambas condiciones de pH, el descenso en la concentración de O₂ en ausencia del nucleótido fue despreciable en comparación con lo observado en presencia del mismo (Figura 12.8). Estos resultados muestran claramente que el proceso fotosensibilizado consume O₂ del medio de reacción.

A partir del análisis por HPLC de las soluciones irradiadas en estos experimentos, se pudo obtener la variación en la concentración de dGMP. La misma fue comparada con el consumo de O₂. Para la fotólisis en medio ácido, con un tiempo de fotólisis de 37 minutos el consumo de O₂ fue 108 μM, mientras que el consumo de dGMP fue 107 μM. Es decir, se consume un mol de dGMP por cada mol de O₂ consumido durante la irradiación. Para el experimento en medio alcalino, luego de 150 minutos de irradiación, las variaciones que se obtuvieron fueron de 125 y 95 μM, para O₂ y dGMP, respectivamente. Estos resultados revelan un consumo de O₂ ligeramente superior al que corresponde a una estequiometría 1:1. Esto podría deberse a un error experimental o a reacciones secundarias que también consuman O₂.

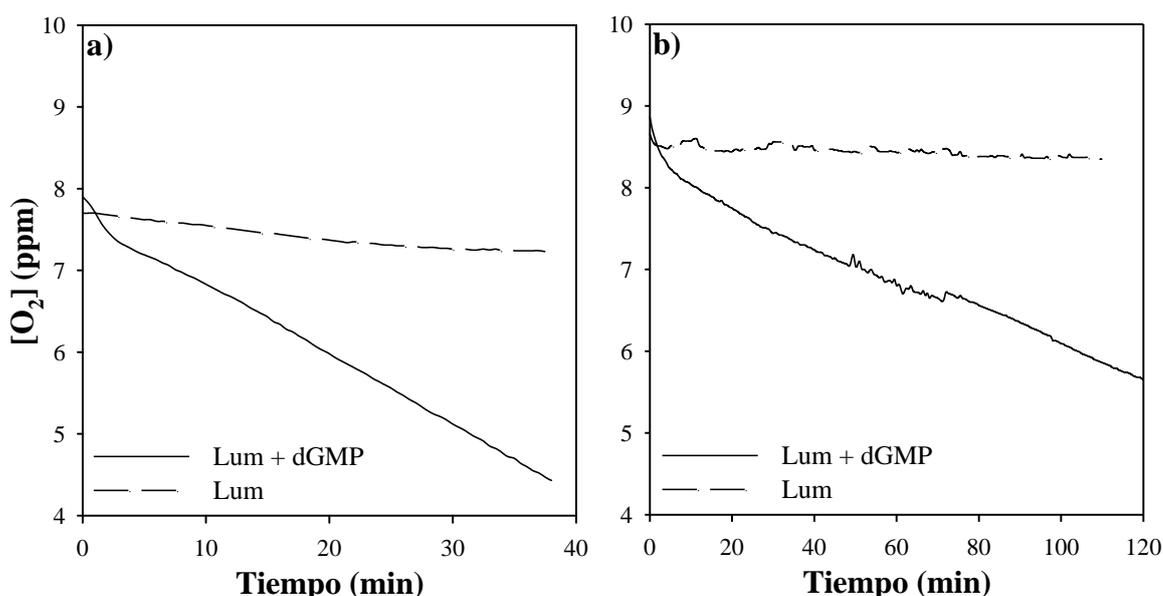


Figura 12.8: Evolución de la concentración de O_2 disuelto durante la irradiación de una solución de dGMP y Lum. a) pH = 5,5; $\lambda_{exc} = 300$ nm; $[dGMP]_0 = 320$ μ M; $[Lum]_0 = 160$ μ M; b) pH = 10,5; $\lambda_{exc} = 350$ nm; $[dGMP]_0 = 180$ μ M; $[Lum]_0 = 45$ μ M. En líneas discontinuas, fotólisis de Lum en ausencia de dGMP.

12.4.2 Dependencia del consumo de dGMP con la concentración de O_2

En otra serie de experimentos, llevados a cabo utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico, soluciones de Lum y nucleótido fueron irradiadas en ambas condiciones de pH previamente equilibradas con Ar u O_2 . Con fines comparativos, se utilizaron las mismas condiciones descritas en las secciones anteriores para los experimentos realizados en soluciones equilibradas con aire.

En la Figura 12.9 se muestran los espectros de las soluciones equilibradas en Ar, a distintos tiempos de irradiación. Como se puede apreciar, en condiciones anaeróbicas no se observaron cambios espectrales significativos en ambas condiciones de pH. Además el análisis cromatográfico muestra que tanto la concentración de Lum como la de dGMP permanecen constantes, aún luego de una hora de irradiación. Los resultados presentados hasta aquí, en esta sección, muestran que no sólo se consume O_2 en la reacción fotosensibilizada, sino que, en su ausencia no existe consumo fotoinducido de dGMP.

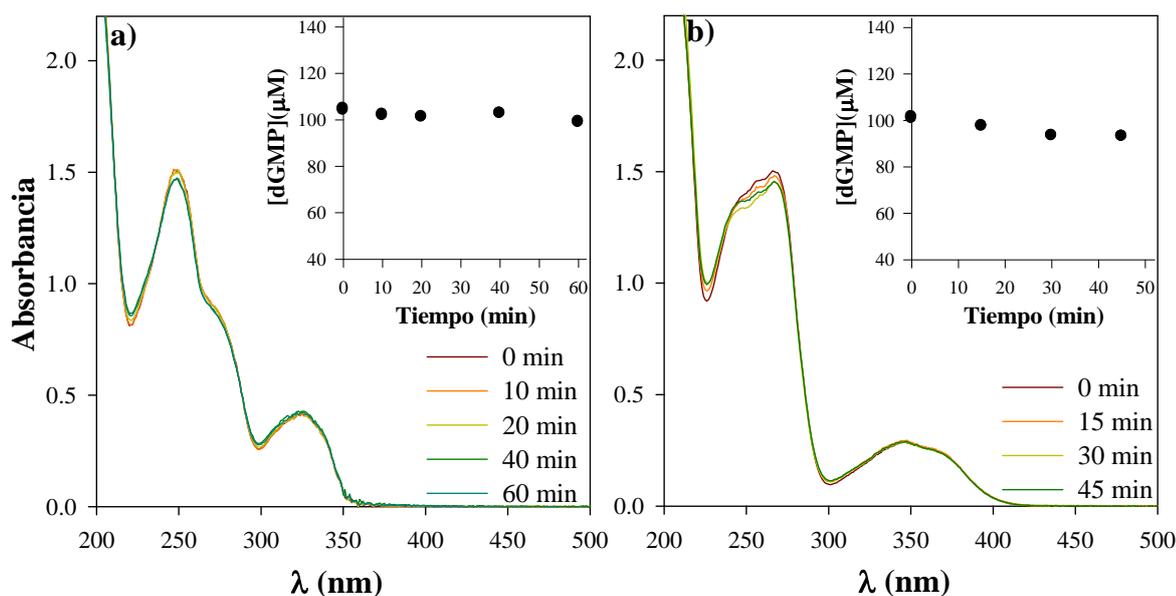


Figura 12.9: Irradiación de una solución de Lum y dGMP en atmósfera de Ar: a) pH = 5,5; $\lambda_{exc} = 300$ nm; $[Lum]_0 = 60 \mu$ M; $[dGMP]_0 = 105 \mu$ M y b) pH = 10,5; $\lambda_{exc} = 350$ nm; $[Lum]_0 = 60 \mu$ M; $[dGMP]_0 = 100 \mu$ M. Insertos: Variación de la concentración de dGMP en función del tiempo de irradiación.

Asimismo se realizaron experimentos en atmósfera saturada con O_2 , y los resultados se compararon con los obtenidos para soluciones aireadas. En la Figura 12.10 se muestran los perfiles de concentración obtenidos por HPLC, en los cuales se puede ver que la velocidad de consumo de dGMP en solución aireada es mayor que en atmósfera saturada con O_2 . Este efecto es muy marcado en medio ácido, en el cual la reacción se inhibe casi por completo en atmósfera de O_2 . Por el contrario, la diferencia entre las velocidades de consumo de dGMP obtenidas para las dos condiciones no es tan marcada en medio alcalino.

Teniendo en cuenta que el O_2 es un desactivador típico de los estados triplete y, en cambio, no desactiva significativamente los estados excitados singlete de Lum (Capítulo 9), los resultados aquí obtenidos permiten sospechar que el estado excitado triplete de Lum está involucrado en el mecanismo. Aún más, las fotólisis comparativas en aire y O_2 permiten realizar algún tipo de especulación sobre el tipo de mecanismo involucrado. Si el mecanismo fuera exclusivamente de Tipo II (por 1O_2), el aumento en la concentración de O_2 debería aumentar la concentración en estado estacionario de 1O_2 y, por ende, aumentar, o al menos no disminuir, la velocidad del proceso fotosensibilizado. Por otro lado, en un

mecanismo Tipo I, en el que participa el estado excitado triplete del sensibilizador ($^3\text{Sens}^*$), el aumento de la concentración de O_2 debería producir un descenso en la concentración de estado estacionario del mismo y, consecuentemente, una inhibición del proceso fotosensibilizado. De este análisis se puede inferir que, en el sistema investigado, en ambas condiciones de pH operan tanto mecanismo Tipo I como Tipo II.

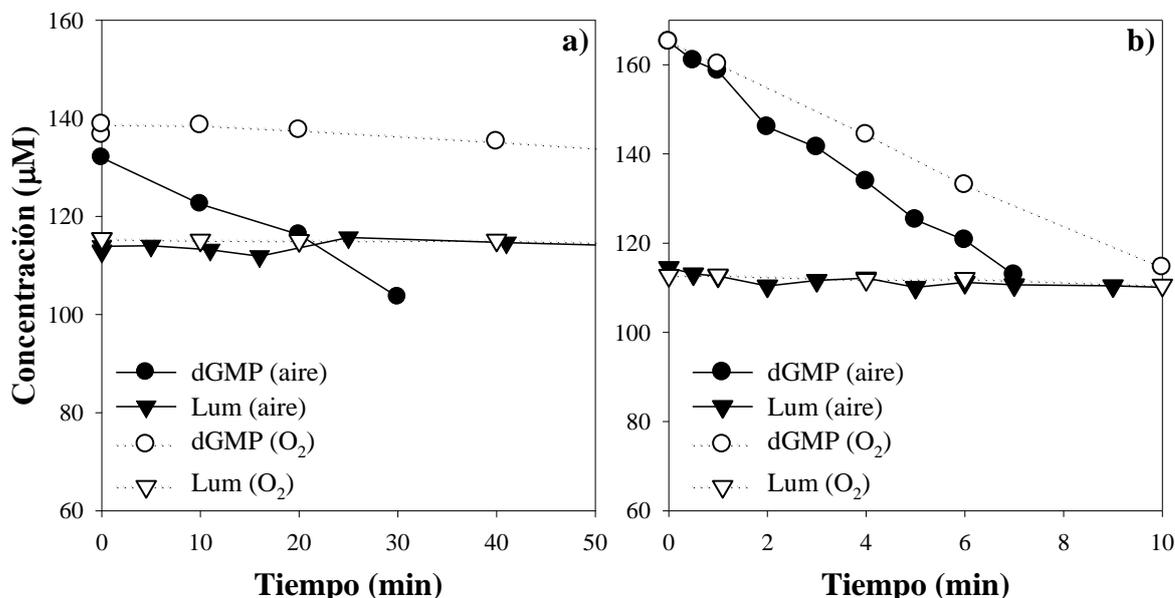


Figura 12.10: Evolución de las concentraciones de dGMP y Lum en función del tiempo de irradiación. Soluciones aireadas y saturadas con O_2 . a) pH = 5,5; $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$; $[\text{Lum}]_0 = 113 \text{ }\mu\text{M}$, $[\text{dGMP}]_0 \sim 135 \text{ }\mu\text{M}$. b) pH = 10,5; $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$; $[\text{Lum}]_0 = 113 \text{ }\mu\text{M}$; $[\text{dGMP}]_0 = 164 \text{ }\mu\text{M}$.

12.5 Participación del oxígeno singlete

Haciendo un análisis similar al realizado para la fotosensibilización de dAMP (Capítulo 11), se puede evaluar la contribución de la reacción entre dGMP y $^1\text{O}_2$ sobre el proceso global utilizando los valores de las constantes de reacción química (k_r^{dGMP}) y de desactivación total de $^1\text{O}_2$ por dGMP (k_t^{dGMP}).³ A partir de la ecuación 1 se puede calcular la velocidad inicial de reacción química entre $^1\text{O}_2$ y dGMP:

$$(d[\text{dGMP}]/dt)_0 = -k_r^{\text{dGMP}} [^1\text{O}_2] [\text{dGMP}]_0 \quad (1)$$

La concentración de estado estacionario de $^1\text{O}_2$ de una solución irradiada de Lum y dGMP puede calcularse usando la ecuación 2:

$$[^1\text{O}_2] = q_{p,\lambda}^v \Phi_{\Delta}^{\text{Lum}} / (k_d + k_t^{\text{Lum}} [\text{Lum}] + k_t^{\text{dGMP}} [\text{dGMP}]_0) \quad (2)$$

donde $q_{p,\lambda}^v$ y $\Phi_{\Delta}^{\text{Lum}}$ son la intensidad de radiación absorbida por el sensibilizador y el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$, respectivamente; k_d es la constante de velocidad de desactivación de $^1\text{O}_2$ no radiativa, k_t^{Lum} y k_t^{dGMP} son las constantes de velocidad de la desactivación total de $^1\text{O}_2$ por Lum y dGMP, respectivamente. Considerando los valores de Φ_{Δ} y k_t^{Lum} determinados en el Capítulo 10, los valores de k_t^{dGMP} en D_2O , en ambas condiciones de pH, ya publicados,³ y los respectivos valores de $q_{p,\lambda}^v$, es posible calcular la $[^1\text{O}_2]$, con la cual luego se puede estimar la velocidad inicial de reacción entre el $^1\text{O}_2$ y dGMP para una $[\text{dGMP}]_0$ dada. Se observó que en ambas condiciones de pH, la velocidad inicial de reacción entre $^1\text{O}_2$ y dGMP ($((d[\text{dGMP}]/dt)_{\text{calc}})$ calculada de las ecuaciones fue mucho menor que la velocidad inicial experimental ($((d[\text{dGMP}]/dt)_{\text{exp}})$) (Tabla 12.1), indicando que la reacción química entre dGMP y $^1\text{O}_2$ no es la vía principal responsable de la fotooxidación de dGMP por Lum.

Para corroborar esta hipótesis, se realizaron fotólisis comparativas de mezclas conteniendo Lum y dGMP en H_2O y en D_2O . Se analizó la evolución de los espectros de absorción y las concentraciones de dGMP, Lum y H_2O_2 en función del tiempo de irradiación (Figura 12.11).

Dado que el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ en D_2O es mayor que en H_2O (es decir $k_d(\text{H}_2\text{O}) > k_d(\text{D}_2\text{O})$),⁴ la oxidación fotosensibilizada de dGMP debería ser más rápida en el solvente deuterado si el $^1\text{O}_2$ contribuyera significativamente al proceso. Aunque el valor de $(d[\text{dGMP}]/dt)_{\text{exp}}$ aumentó visiblemente al cambiar el solvente de H_2O a D_2O , el efecto isotópico observado es menor al esperado si la reacción ocurriese únicamente mediante un mecanismo de fotooxidación tipo II. (Tabla 12.1). Estos resultados sugieren que la reacción química entre dGMP y el $^1\text{O}_2$, a pesar de no ser despreciable, no parece ser la vía principal responsable de la oxidación fotosensibilizada de dGMP.

	[Lum] ₀	[dGMP] ₀	(d[dGMP]/dt) _{calc}	(d[dGMP]/dt) _{exp}
	μM	μM	(μM/min)	(μM/min)
pH ácido				
H₂O	83	115	0,06	0,65
D₂O	83	108	0,96	2,0
pH alcalino				
H₂O	93	123	2,18	8,0
D₂O	96	130	24,6	20,2

Tabla 12.1: Comparación entre la velocidad inicial de consumo de dGMP (d[dGMP]/dt)₀ experimental (determinada mediante experimentos de HPLC) y la velocidad inicial de reacción con ¹O₂ calculada a partir de las ecuaciones 1 y 2 para distintos solventes.

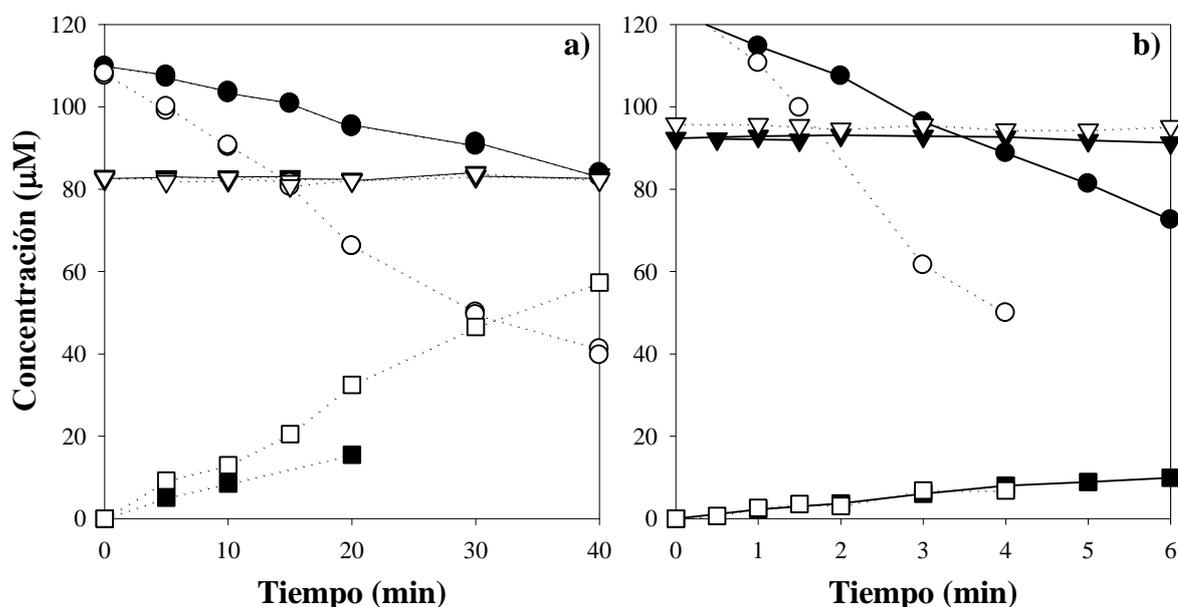
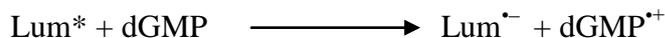


Figura 12.11: Evolución de la concentración de dGMP (●), Lum (▼) y H₂O₂ (■) en soluciones preparadas en H₂O (símbolos en negro) y D₂O (símbolos en blanco). a) λ_{exc} = 300 nm; pH = 5,5 y pD = 5,5. b) λ_{exc} = 350 nm; pH = 10,5 y pD = 10,5. Para ambas condiciones, [dGMP]₀ = 108 μM y [Lum]₀ = 83 μM.

En base a los resultados expuestos hasta aquí, se puede inferir que la oxidación de dGMP fotosensibilizada por Lum en los dos medios ocurre a través de ambos mecanismos, con un predominio del tipo I, el cual, teniendo presente los resultados obtenidos en el estudio de la fotosensibilización de dAMP (Capítulo 11) y los numerosos estudios en bibliografía sobre transferencia de electrones con bases púricas (Capítulo 2), seguramente

comienza con una transferencia de electrones entre la molécula de dGMP y el estado excitado de Lum.



12.6 Participación del anión superóxido

Tal como se discutió en capítulos anteriores, la formación del anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) es muy frecuente en los procesos fotosensibilizados que ocurren mediante un mecanismo Tipo I. Para verificar si la formación de H_2O_2 proviene de la dismutación espontánea del $\text{O}_2^{\bullet-}$, se realizaron experimentos en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD) ⁵ (Capítulo 5). Los resultados muestran que la velocidad de producción de H_2O_2 es mayor en presencia de SOD.

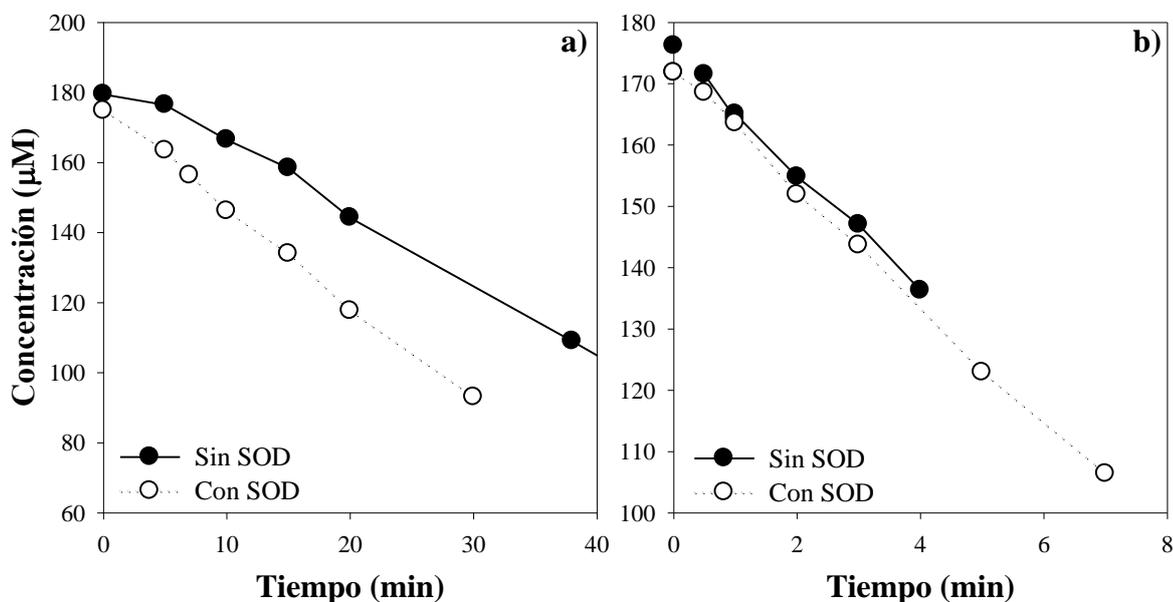


Figura 12.12: Evolución de la concentración de dGMP para soluciones de Lum y dGMP en ausencia y presencia de SOD (160 U / ml). a) $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$; pH = 5,5; $[\text{dGMP}]_0 = 179 \mu\text{M}$; $[\text{Lum}]_0 = 100 \mu\text{M}$. b) $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$; pH = 10,5; $[\text{dGMP}]_0 = 175 \mu\text{M}$; $[\text{Lum}]_0 = 100 \mu\text{M}$.

Adicionalmente, en medio ácido, al igual que lo observado en el estudio de la fotosensibilización de dAMP, se observó un significativo aumento del consumo de dGMP cuando se adicionó la enzima a la mezcla de reacción (Figura 12.12). Estos resultados indican que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ está presente en el proceso fotosensibilizado, y provee evidencia sobre la existencia de una reacción de transferencia de electrones. Asimismo, indica que el $\text{O}_2^{\bullet-}$

participa en etapas en las cuales el nucleótido se recupera, es decir, reacciones de anulación de radicales que, al eliminarse, aumentan el consumo del sustrato. Por el contrario en medio alcalino, la velocidad no se modifica al agregar enzima a la mezcla de reacción, lo que lleva a pensar que no se produce $O_2^{\bullet-}$, o si lo hace, no participa en reacciones de recuperación de sustrato.

12.7 Participación del estado excitado triplete de Lumazina

Los resultados mostrados en las secciones precedentes, sugieren que la fotosensibilización de dGMP por Lum ocurre a través de una competencia entre mecanismos Tipo I y Tipo II, pero ambos desencadenados por el estado triplete de Lum ($^3Lum^*$). Sin embargo, aún no se han presentado resultados que revelen de forma unívoca la participación de este estado excitado en el proceso estudiado. Con el objeto de confirmar esta hipótesis se realizaron dos grupos de experimentos, cuyos resultados se exponen en esta sección: fotólisis estacionaria en presencia de yoduro de potasio y estudios mediante experimentos resueltos en el tiempo.

12.7.1 Fotólisis estacionaria en presencia de yoduro de potasio

En base a los estudios mostrados en el Capítulo 9, se trabajó con concentraciones de I^- de manera de desactivar el estado triplete ($^3Lum^*$) sin afectar el estado singlete de Lum ($^1Lum^*$). Para ello se prepararon soluciones conteniendo Lum y dGMP, y se realizaron experimentos comparativos en ausencia y presencia de $KI = 200 \mu M$. En medio ácido, los resultados revelan que, en presencia de I^- a las concentraciones usadas, la velocidad de consumo de nucleótido decrece notablemente comparada con la obtenida en ausencia del mismo (Figura 12.13a). Estos resultados refuerzan la teoría que es el $^3Lum^*$ quien participa en los primeros pasos del proceso fotosensibilizado. Por el contrario, en medio alcalino, la velocidad de consumo de dGMP prácticamente no sufre modificaciones cuando el anión I^- está presente en la solución (Figura 12.13b); lo cual coincide perfectamente con lo esperado, dado que como se demostró en el Capítulo 9, el $^3Lum^*$ en presencia de concentraciones entre 0 y $350 \mu M$ de anión I^- , no es desactivado en este medio.

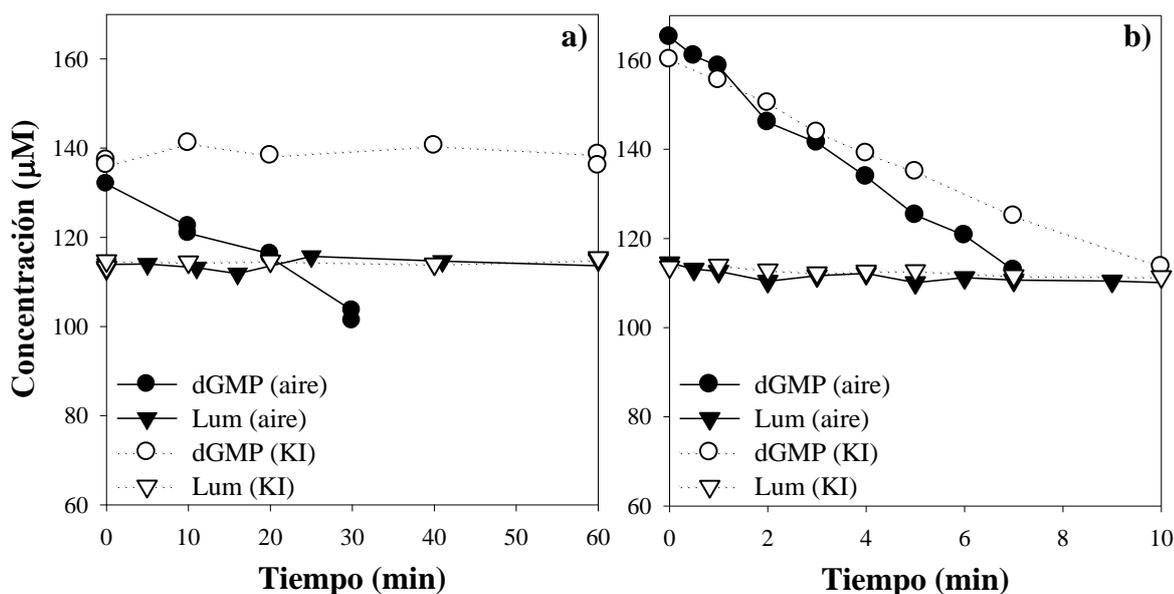


Figura 12.13: Evolución de la concentración de dGMP y Lum en función del tiempo de irradiación en ausencia y presencia de 200 μM de KI. a) $\text{pH} = 5,5$; $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$; $[\text{Lum}]_0 = 113 \mu\text{M}$, $[\text{dGMP}]_0 \sim 135 \mu\text{M}$. b) $\text{pH} = 10,5$; $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$; $[\text{Lum}]_0 = 113 \mu\text{M}$; $[\text{dGMP}]_0 = 164 \mu\text{M}$.

12.7.2 Desactivación del triplete de Lumazina por dGMP

Los resultados mostrados hasta aquí sugieren que el $^3\text{Lum}^*$ juega un papel clave en la oxidación fotosensibilizada de dGMP. Sin embargo, la evidencia directa de la interacción entre del $^3\text{Lum}^*$ y el estado fundamental de dGMP aun no se ha presentado. Esta interacción es necesaria en los mecanismos de fotooxidación Tipo I. Con este objetivo se realizaron estudios de desactivación mediante experimentos resueltos en el tiempo.

En medio ácido, se evidenció la interacción entre $^3\text{Lum}^*$ y dGMP indirectamente por medio de la señal infrarroja del $^1\text{O}_2$, al igual que en el caso de dAMP, desarrollado en el capítulo anterior (Sección 11.7.2). Brevemente, se prepararon soluciones de Lum en D_2O , a $\text{pD} = 5,5$ y se agregaron cantidades crecientes de dGMP (también en D_2O). Las mezclas se irradiaron con el pulso del láser a 309 nm y para cada concentración de dGMP agregada, se registró una señal, de la cual fue posible obtener el tiempo de vida del $^3\text{Lum}^*$. Para calcular la constante de velocidad bimolecular de desactivación (k_q^{dGMP}) se hizo un análisis Stern- Volmer, ecuación 3:

$$\tau_T^0/\tau_T = 1 + k_q^{\text{dGMP}} \tau_T^0 [\text{dGMP}] \quad (3)$$

donde τ_T^0 y τ_T son el tiempo de vida del $^3\text{Lum}^*$ en ausencia y en presencia de desactivador,

respectivamente. Es importante mencionar que en este caso, cuando se habla de τ_T^0 , se trata del tiempo de vida del $^3\text{Lum}^*$ en aire. El valor de k_q^{dGMP} , obtenido a partir de la pendiente del gráfico de Stern-Volmer, es $(3,5 \pm 0,9) 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

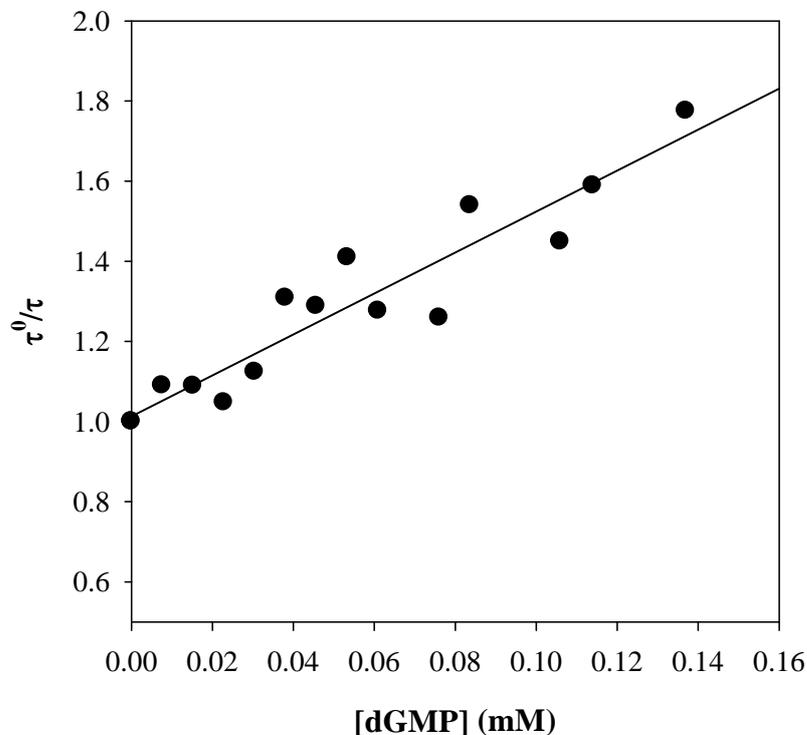


Figura 12.14: Experimentos de $^1\text{O}_2$. Análisis Stern-Volmer. Desactivación de $^3\text{Lum}^*$ por dGMP. pD = 5,5. $\lambda_{\text{exc}} = 309 \text{ nm}$.

Tal como se describió en el Capítulo 7, para los experimentos de desactivación de $^3\text{Lum}^*$ a pH alcalino, se prepararon mezclas acuosas de Lum y dGMP (en atmósfera de N_2), se las irradió con el láser de Nd-YAG con $\lambda = 355 \text{ nm}$ y se evaluó la magnitud de ambos tiempos de vida con el incremento de la concentración de nucleótido mediante un análisis de Stern-Volmer (Figura 12.15). De dicho análisis se desprende que ni el tiempo de vida asignado al triplete de Lum, ni el tiempo de vida más largo sufrieron cambios significativos al agregar dGMP; por lo que se puede concluir que dentro de las concentraciones usadas, no hay desactivación evidente de $^3\text{Lum}^*$ por dGMP a pH alcalino.

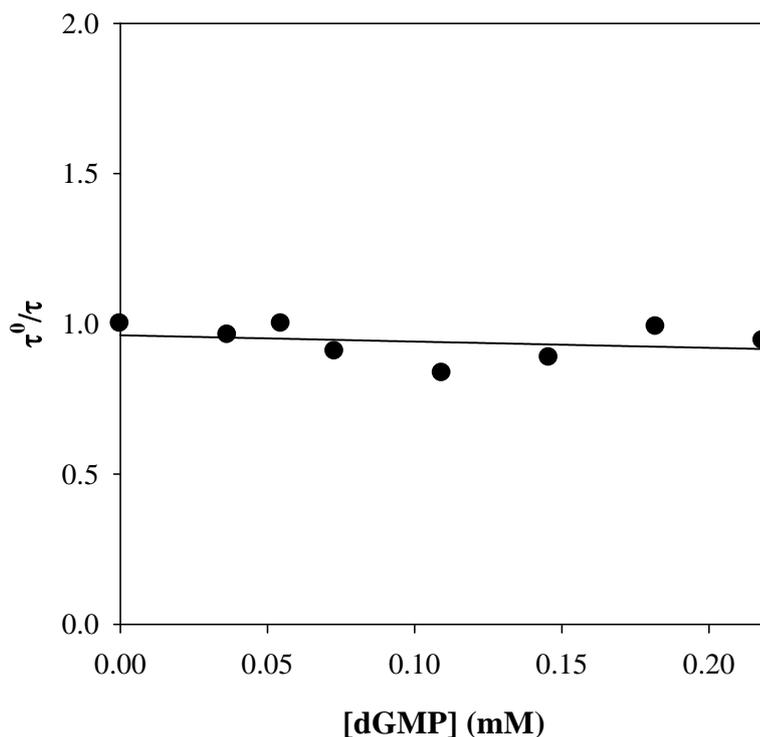


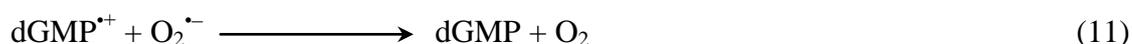
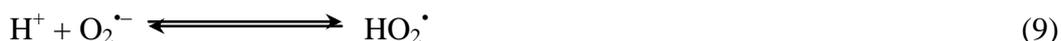
Figura 12.15: Análisis Stern-Volmer. Desactivación de $^3\text{Lum}^*$ por dGMP. pH = 10,5. $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$.

Estos resultados proporcionan evidencia directa de la interacción del $^3\text{Lum}^*$ con dGMP, pero también indican que la desactivación en medio ácido es más eficiente que en medio alcalino. La fuerte variación de k_q^{dGMP} con el pH puede ser debido a la diferencia en la carga de las moléculas. Esta diferencia, reflejada en los valores de k_q^{dGMP} puede deberse a la diferencia en la carga entre las dos formas ácido-base de Lum. Si la desactivación de $^3\text{Lum}^*$ implica un mecanismo de transferencia de carga, el estado excitado de la forma alcalina será un aceptor de electrones menos eficiente por ser una molécula cargada negativamente.

12.8 Mecanismos de reacción

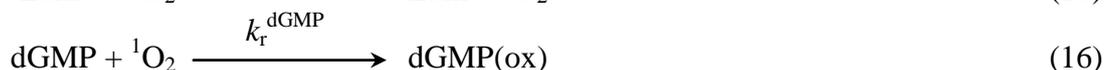
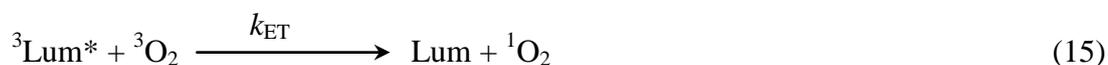
Teniendo en cuenta todos los resultados presentados previamente en este capítulo, se puede asegurar que la fotooxidación de dGMP sensibilizada por Lum ocurre a través de una competencia entre mecanismos de Tipo I y de Tipo II.

El proceso de transferencia de electrones se resume en el siguiente esquema de reacciones:



Resumiendo, la excitación de Lum que ocurre por la absorción de luz, es seguida por una transferencia de electrones entre ${}^3\text{Lum}^*$ y dGMP, dando lugar a la formación del par radical $\text{Lum}^{\bullet-}$ y $\text{dGMP}^{\bullet+}$. El radical anión $\text{Lum}^{\bullet-}$ reacciona con O_2 , reacción que recupera el estado basal de Lum y produce $\text{O}_2^{\bullet-}$. Este anión puede desproporcionarse para generar H_2O_2 y O_2 , o reaccionar con el radical catión $\text{dGMP}^{\bullet+}$ para regenerar el dGMP. Por último, el radical catión $\text{dGMP}^{\bullet+}$ reacciona con O_2 o H_2O , para formar los productos oxidados del nucleótido.

Por otro lado, el mecanismo Tipo II es la reacción entre el nucleótido y el oxígeno singlete:



Si bien evaluar la contribución relativa de cada uno de los mecanismos en las distintas condiciones de pH es difícil, existiría una contribución de ambos mecanismos tanto en medio alcalino como en medio ácido.

12.9 Referencias

- 1 J.-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2001**, 63, 88–102
- 2 E. Clennan, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 9151-9179
- 3 G. Petroselli, M. L. Dántola, F. M. Cabrerizo, A. L. Capparelli, C. Lorente, E. Olivero, A. H. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 3001-3011
- 4 P. R. Ogilby, C. S. Foote *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 3423-3430
- 5 B. H. J. Bielski, D. E. Cabelli, R. L. Arudi, A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1985**, 14, 1041-1100

Capítulo 13

Efecto fotodinámico de Lumazina sobre células HeLa

Los efectos de la exposición de los seres vivos a la radiación ultravioleta y visible (UV-vis) han sido extensamente estudiados.^{1,2} Hasta hace un par de décadas se creía que sólo la luz UV de alta energía ocasionaba daño a macromoléculas tales como ADN y proteínas, produciendo en consecuencia, daño celular. Sin embargo, esta radiación es poco dañina para los tejidos celulares por la escasa capacidad de penetración tisular. Más recientemente ha sido establecido el daño celular provocado por la luz UV-A y visible, ya que penetran más profundamente en las estructuras celulares. Se ha observado que el daño está mediado principalmente por la participación de especies reactivas de oxígeno (EROs).³

La absorción de luz por moléculas intracelulares lleva a la generación de estados excitados singletes y tripletes que pueden ser dañinos en sí mismos o reaccionar con oxígeno generando EROs. La producción de estas especies ocasiona alteraciones en la estructura celular, en la expresión de genes e inician procesos mutagénicos^{4,5}

Debido a que la Lumazina (Lum) es un buen sensibilizador de $^1\text{O}_2$ (Capítulo 10), una especie reactiva altamente dañina para las células (Capítulo 1) y que puede actuar como sensibilizador a través de procesos de transferencia de energía, por su presencia en los sistemas biológicos, Lum es potencialmente dañina para los seres vivos. Sin embargo, la correlación entre las propiedades fotofísicas de un sensibilizador dado y su fotoactividad biológica no siempre es sencilla y depende de muchos factores ambientales.⁶ Por lo tanto, la irradiación de líneas celulares eucariotas en presencia de un fotosensibilizador dado permite investigar si los procesos fotoinducidos tienen efectos a nivel celular.

Para evaluar la capacidad foto-citotóxica de Lum, se plantearon experimentos con cultivos celulares. Se evaluó la capacidad de Lum de ingresar a las células y producir daño en ellas. En este trabajo se utilizaron cultivos de carcinoma cervical humano, llamados células HeLa (Capítulo 8).

13.1 Estudio de la captación celular del fotosensibilizador

Para investigar si Lum es capaz de “ingresar” a las células se realizó un análisis espectrofluorométrico de los extractos celulares y los resultados obtenidos se compararon con las propiedades de emisión del sensibilizador. En este sentido, ambas formas ácido-

base de Lum poseen diferentes espectros de emisión, diferentes espectros de excitación y también diferentes rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F)⁷ (Capítulo 9). Estas propiedades se utilizaron para evaluar la captación de Lum por parte de las células HeLa.

Para la preparación de los extractos se tomaron, para cada condición ensayada, cuatro cubreobjetos y se los incubó a 37 °C durante 6 hs, tiempo suficiente para permitir que el sensibilizador penetre en la célula, sin producir efecto tóxico en ella, tal como se describirá más adelante en la Sección 13.2. Luego se procedió a la lisis con DMSO y a los extractos resultantes se los colocó en cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico para su posterior análisis por espectrofluorimetría (Capítulo 8). Los experimentos se realizaron sobre dos tipos de extractos que serán llamados “extractos control” y “extractos Lum”. Los extractos control son aquellos en los cuales las células HeLa están incubadas en ausencia del sensibilizador; y los extractos Lum, aquellos en los cuales las células están incubadas en presencia del mismo.

Se realizaron espectros de excitación-emisión para ambos extractos celulares. En la Figura 13.1 se compara la intensidad de fluorescencia de los mismos. El extracto control presenta una débil emisión fluorescente que se debe a la presencia de fluoróforos presentes normalmente en el interior celular (Figura 13.1.a). El extracto celular incubado con Lum presenta mayor intensidad de fluorescencia que el extracto control bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 13.1.b).

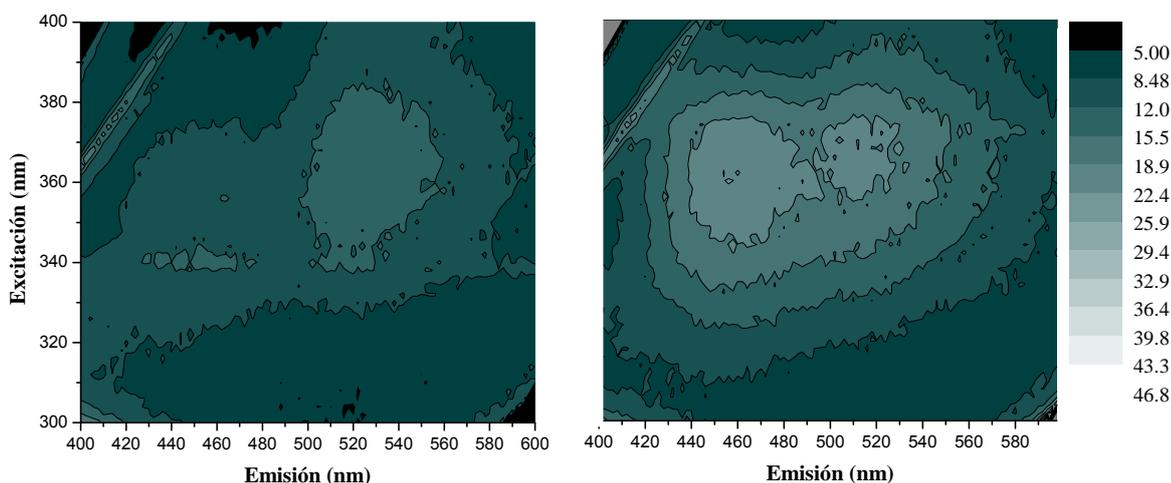


Figura 13.1: Espectros de excitación-emisión de extractos de células HeLa a pH = 7,4. (a) Extracto control y (b) Extracto Lum (40 μ M) analizados inmediatamente luego de su preparación.

Bajo las condiciones de incubación (pH = 7,4), la forma ácida de Lum es la forma acido-base predominante (Capítulo 9). Para los extractos con Lum, la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión ($\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$) obtenido al excitar en la zona correspondiente a la banda de absorción de menor energía de Lum (~ 330 nm) fue la misma, dentro del error experimental, al $\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ obtenido al excitar una solución estándar de Lum a pH 5,5 (474 ± 6 nm) (Figura 13.2). Cabe aclarar que, si bien los extractos control presentan espectros de emisión propios, en ningún caso ni la forma de los espectros, ni la posición de los máximos de emisión se corresponden con aquellos obtenidos de una solución estándar de Lum (Figura 13.2).

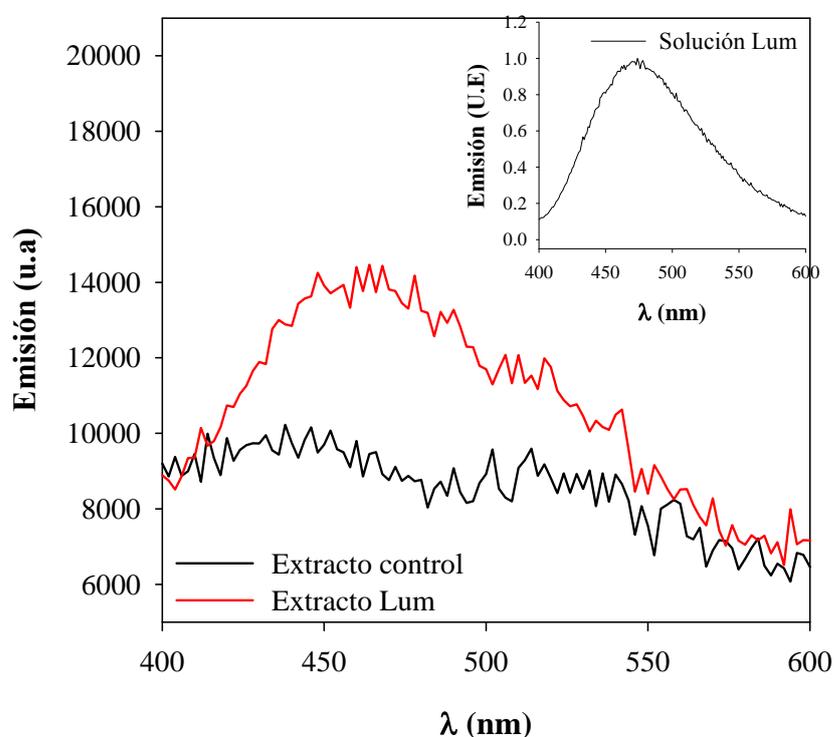


Figura 13.2: Emisión extraída de las Figuras 13.1 a) y b) en la misma escala para facilitar su comparación. Inserto: Emisión de una solución de Lum a pH 5,5. $\lambda_{exc} = 330$ nm.

Suponiendo que la fluorescencia detectada en los extractos celulares incubados con Lum se debe efectivamente al sensibilizador, los espectros de emisión y excitación deberían manifestar la misma dependencia con el pH que presenta una solución estándar de Lum, tal como fue descrito en el Capítulo 9. Por lo tanto, en otro conjunto de experimentos, se analizó la fluorescencia de los extractos (con y sin sensibilizador) luego de ajustar el pH de los mismos alrededor de 10,5 mediante el agregado de micro gotas de solución de NaOH (Figura 13.3).

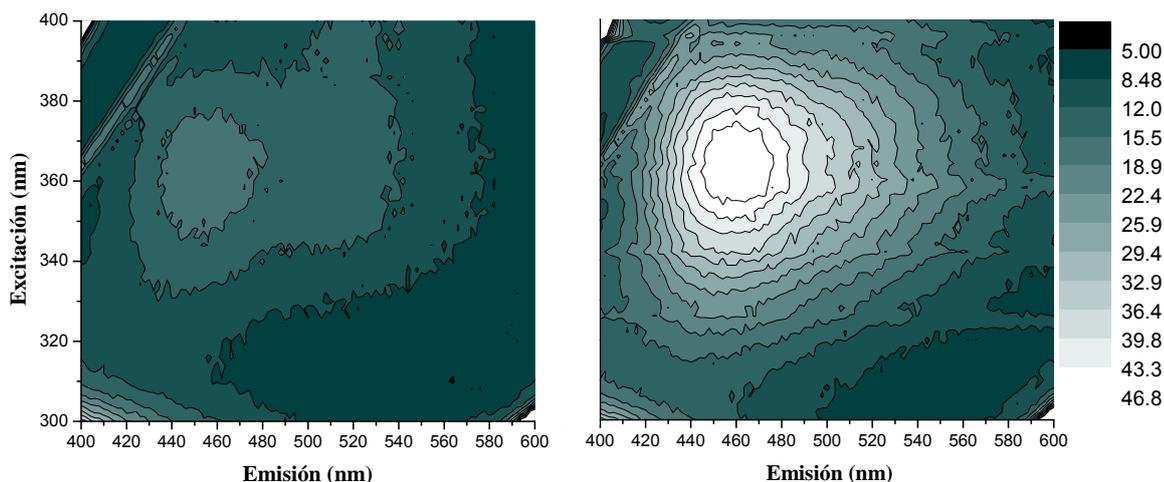


Figura 13.3: Espectros de excitación-emisión de extractos de células HeLa a pH = 10,5. (a) Extracto control y (b) Extracto Lum (40 μ M) analizados inmediatamente luego de su preparación.

Como se puede ver en la Figura 13.3, al alcalinizar los extractos, solamente se incrementó, y de manera notoria, la emisión de la muestra que corresponde al extracto Lum. Este resultado es compatible con la dependencia del rendimiento cuántico de fluorescencia de Lum (Φ_F) con el pH. Tal como se detalló en el Capítulo 9, la forma alcalina de Lum presenta un valor de Φ_F mayor que el de la forma ácida. Por otro lado, se vio que los espectros de emisión de los extractos alcalinizados resultaron ser, dentro del error experimental, equivalentes a los de una solución estándar de Lum de pH = 10,5.

Los resultados hasta aquí obtenidos son una evidencia de la incorporación de Lum en los extractos celulares. Por lo tanto, se puede inferir que bajo las condiciones experimentales utilizadas, Lum es capaz de penetrar y localizarse dentro de dominios intracelulares o, al menos, asociarse a las membranas de las mismas. Asimismo, si se consideran las intensidades de emisión observadas, y la correspondencia de los espectros registrados de los extractos con los de una solución de Lum, se puede conjeturar que la generación de estados excitados del sensibilizador dentro de la célula es factible.

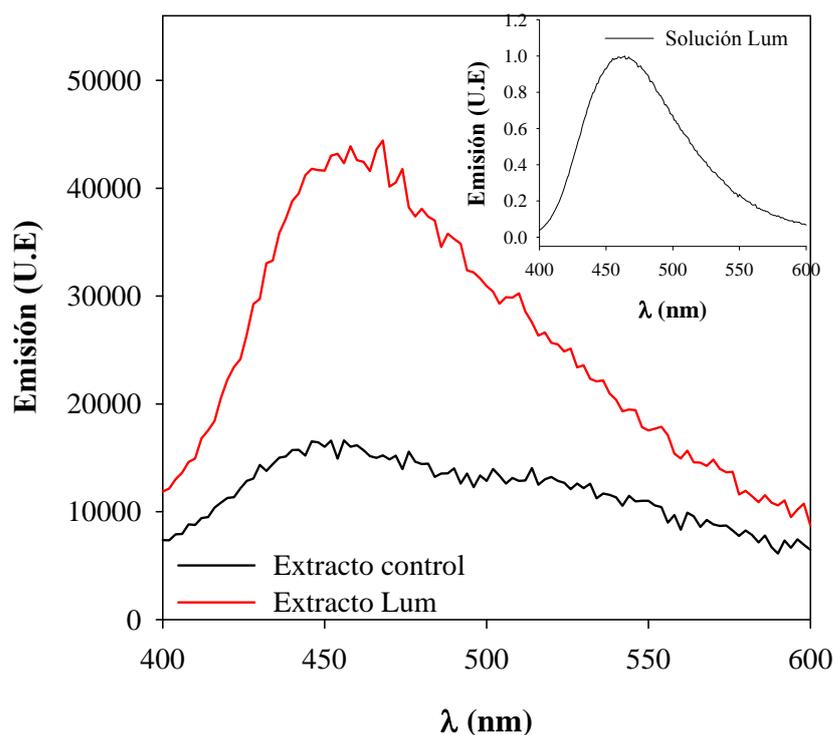


Figura 13.4: Emisión extraída de las Figuras 13.3 a) y b) en la misma escala para facilitar su comparación. Inserto: Emisión de una solución de Lum a pH 10,5. $\lambda_{exc} = 350$ nm.

13.2 Evaluación del efecto fotodinámico de Lumazina mediante el ensayo de Rodamina 123

Una de las formas en las que se evaluó la actividad fotodinámica de Lum, consiste en la tinción de los cultivos con Rodamina 123 (Rh123), los cuales luego fueron evaluados mediante el uso del microscopio invertido *Olympus IX 70* (Capítulo 8). La Rh123 es un colorante fluorescente permeable a las membranas celulares, capaz de acumularse en las mitocondrias de las células vivas como resultado del potencial trans-membrana mitocondrial.^{8,9} Al teñir los cultivos con Rh123, la manifestación de una célula viva, es una imagen fluorescente en la cual la mitocondria está resuelta, y el núcleo no contiene fluoróforo, (a) en la Figura 13.5. Más aún, las mitocondrias en una célula viva están asociadas con estructuras del citoesqueleto y, por ende, se observan dispuestas en forma de “cadenas”.^{10,11} En células que han estado comprometidas a algún tipo de estrés o daño, la fluorescencia de la Rh123 es difusa, y no pueden resolverse las mitocondrias, aunque el núcleo puede aún aparecer en algunas zonas oscuro, (b) en la Figura 13.5. En la cascada apoptótica, uno de los eventos que se produce es la pérdida del potencial trans-membrana, el cual se ve reflejado por una deslocalización del fluoróforo Rh123; razón por la cual en

una célula muerta, la fluorescencia de la Rh123 es difusa, y se puede originar en parte en el núcleo, donde finalmente tiende a localizarse, (c) en la Figura 13.5.⁸

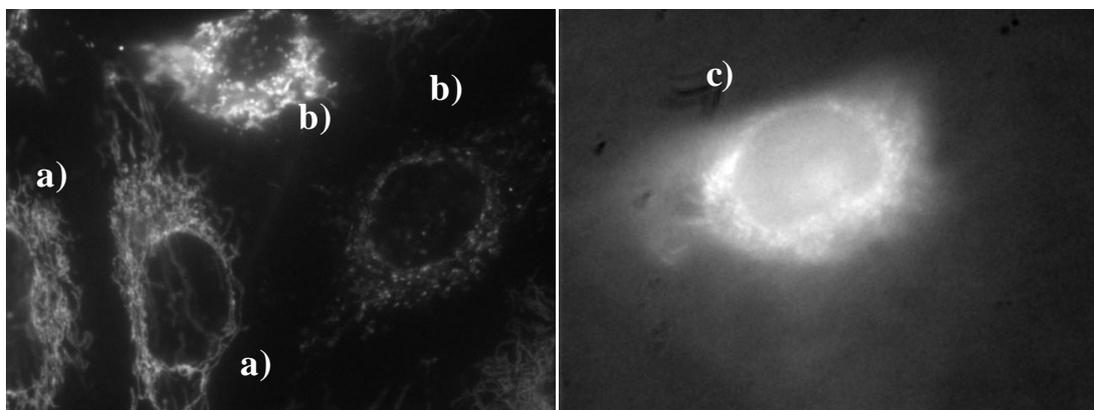


Figura 13.5: Imágenes representativas de células HeLa teñidas con Rh123 registradas con un microscopio *Olympus IX70* (escala 100X). (a) Célula viva, (b) célula comprometida y (c) célula muerta.

El ensayo de Rh123 se llevó a cabo sobre las diferentes poblaciones de células HeLa descritas en el Capítulo 8: control celular, control oscuridad, control luz y luz + Lum (40 o 200 μM).

Para los experimentos realizados en presencia de Lum, se tomaron cultivos celulares crecidos durante 24hs y se los incubó con Lum durante 6hs. Luego de transcurrido el período de incubación, a aquellas poblaciones que correspondiera, se las irradió durante 5 min con la lámpara UV-A ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$) y bajo las condiciones descritas en el Capítulo 8. Por último, las cinco poblaciones se trataron con Rh123 y se analizaron en el microscopio (Capítulo 8).

Para cada población celular, se contaron al menos 500 células, y según la fluorescencia emitida por la Rh123, se clasificó a las mismas en “vivas”, “muertas” o “comprometidas”. En la Figura 13.6 se muestran algunas imágenes relevantes que permiten mostrar a las células tal como fueron identificadas y clasificadas. En las mismas se agregaron flechas señalando cada tipo celular.

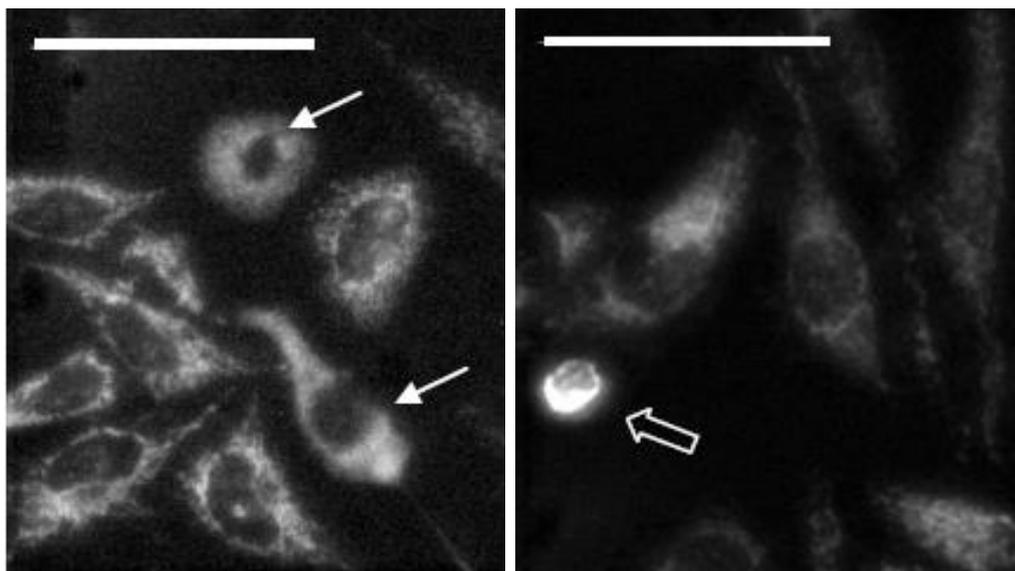


Figura 13.6: Imágenes representativas de células HeLa teñidas con Rh123 registradas con un microscopio *Olympus IX70* (escala 30X). Las flechas llenas, señalan células clasificadas como “comprometidas”, mientras que las flechas vacías señalan células “muertas”. Escala = 100 μm .

Una vez finalizado el conteo y clasificación total de las células, se llevó a cabo el análisis estadístico descrito en el Capítulo 8. Los resultados se muestran en la Figura 13.7; en la cual se puede ver que bajo las condiciones utilizadas, en ausencia de radiación, (control oscuridad), Lum no resulta ser citotóxica. Asimismo, en los resultados obtenidos para el control luz; se puede ver que las dosis de radiación UV usada, no incrementa la cantidad de células alteradas. Por el contrario, se ve claramente que cuando las células incubadas con Lum son irradiadas, la fracción de células comprometidas aumenta con el consiguiente descenso de la fracción de células vivas, y que como era de esperar, al aumentar la concentración de Lum, el cambio en las cantidades relativas de células vivas y comprometidas se hace más pronunciado. Estos resultados demuestran que Lum tiene un efecto fotodinámico sobre células HeLa.

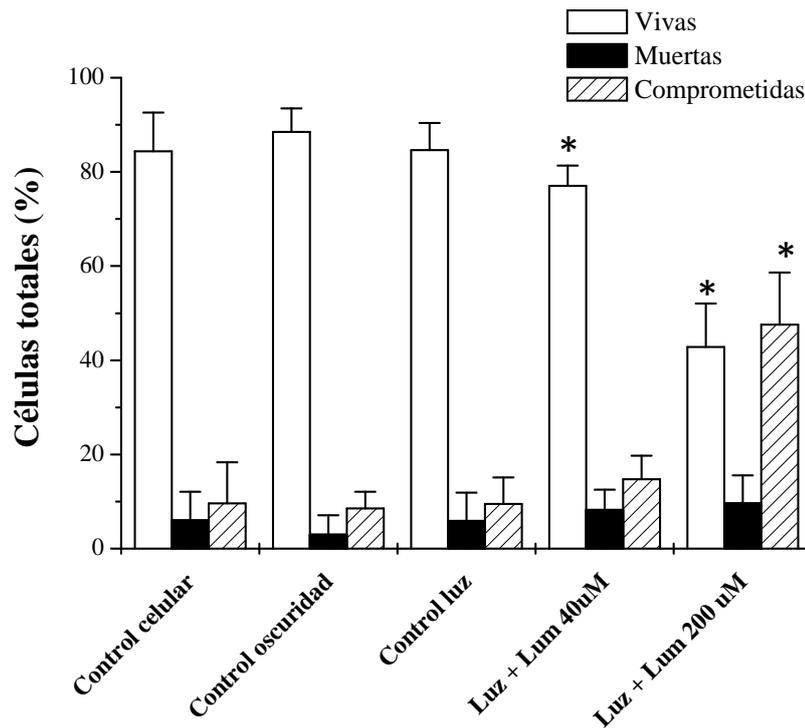


Figura 13.7: Diagrama de barras que muestra los resultados obtenidos en el ensayo de Rh123. Se analizaron las cinco poblaciones ya mencionadas: (i) control celular; (ii) control oscuridad; (iii) control Luz; (iv) luz + Lum: 40 y 200 μM . Las columnas marcadas con asteriscos indican que existe diferencia significativa entre dichas poblaciones y las 3 poblaciones control (Test ANOVA unidireccional).

13.3 Evaluación del efecto fotodinámico de Lumazina mediante el ensayo de Azul de Tripano

Al teñir las células con azul de tripano (TB), se distinguen con claridad las células muertas, ya que éstas se tiñen de un color azul intenso que se visualiza con el microscopio de campo claro. Los diferentes tipos de daño se pueden evaluar si se modifica el tiempo de incubación después del tratamiento.¹²

El ensayo de exclusión con TB se llevó a cabo sobre poblaciones de células HeLa similares a las analizadas con el ensayo de Rh123. En concreto, se emplearon tres poblaciones control (control celular, control oscuridad y control luz) y las células cultivadas en presencia de 2 concentraciones diferentes de Lum e irradiadas (luz + Lum). Para cada población celular, se contaron al menos 500 células y se las clasificó en dos grupos, "muertas" o "vivas", según se tiñan o no con el colorante. En la Figura 13.8 se muestran algunas imágenes relevantes que permiten mostrar las diferentes clases de células tal como fueron clasificadas.

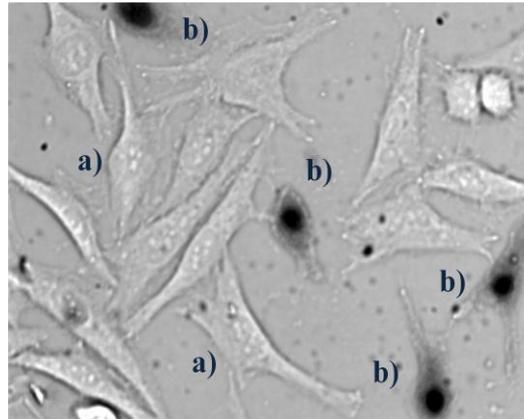


Figura 13.8: Imagen representativa de células HeLa teñidas con TB registradas con un microscopio *Olympus IX70* (escala 20X). (a) Células vivas y (b) células muertas.

El resultado del análisis estadístico correspondiente se muestra en la Figura 13.9. Estos resultados ponen en evidencia que, en ausencia de radiación, Lum no provoca citotoxicidad significativa para las concentraciones de sensibilizador empleadas (hasta 200 μM). Del mismo modo, en ausencia de Lum, la dosis de radiación utilizada no reduce la viabilidad celular. En contraste, el número de células muertas se ve incrementado notablemente sobre las poblaciones celulares irradiadas e incubadas con Lum.

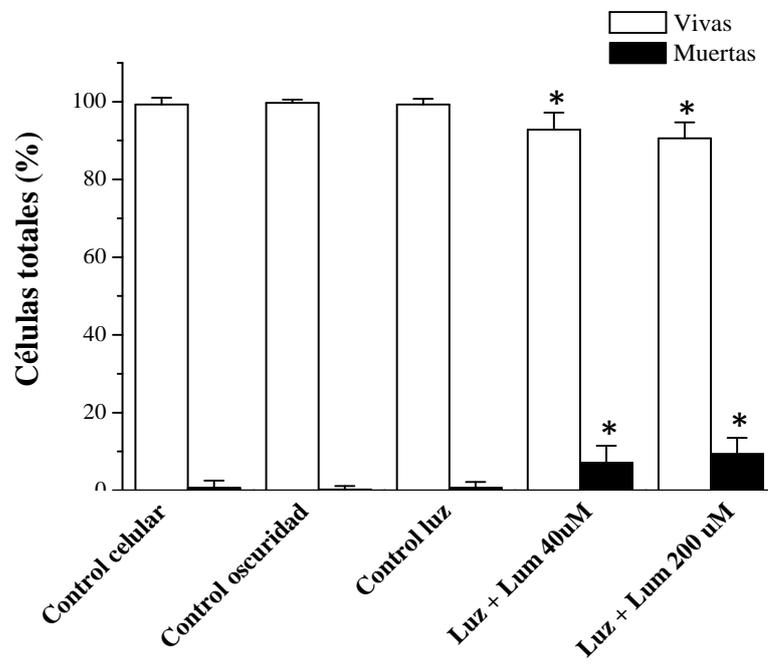


Figura 13.9: Diagrama de barras que muestra los resultados obtenidos en el ensayo de TB. Se analizaron las cinco poblaciones ya mencionadas: (i) control celular; (ii) control oscuridad; (iii) control Luz; (iv) luz + Lum: 40 y 200 μM . Las columnas marcadas con asteriscos indican que existe diferencia significativa entre dichas poblaciones y las 3 poblaciones control (Test ANOVA unidireccional).

13.4 Referencias

- 1 J. C. van der Leun, F. R. Gruijl; *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, 1, 324–326
- 2 Y. Matsumura, H. N. Ananthaswamy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, 195, 298–308
- 3 K. Briviba, L. O. Klotz, H. Sies, *Biol. Chem.*, **1997**, 378, 1259–1265
- 4 I. E. Kochevar, M. C. Lynch, S. Zhuang, C. R. Lambert, *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 72, 548-553
- 5 K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty, *Cancer Res.*, **1976**, 36, 2326-2329
- 6 J. C. Stockert, M. Cañete, A. Juarranz, A. Villanueva, R. W. Horobin, J. I. Borrell, J. Teixidó, S. Nonell, *Curr. Med. Chem.*, **2007**, 14, 997-1026
- 7 R. Klein, I. Tatischeff, *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 45, 55-65
- 8 Z. Darzynkiewicz, G. Juan, X. Li, W. Gorczyca, T. Murakami, F. Traganos, *Cytometry*, **1997**, 27, 1-20
- 9 L.V. Johnson, M. L. Walsh and L. B. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 990-994
- 10 S. Hatz, J. D. C. Lambert, P. R. Ogilby, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, 6, 1106-1116
- 11 T. Breitenbach, M. K. Kuimova, P. Gbur, S. Hatz, N. B. Schack, B. W. Pedersen, J. D. C. Lambert, L. Poulsen, P. R. Ogilby, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2009**, 8, 442-452
- 12 C. Marzano, F. Baccichetti, F. Carlassare, A. Chilin, S. Lora, F. Bordin, *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 71, 263-272

Conclusiones

En este trabajo de Tesis Doctoral se investigaron las propiedades fotosensibilizadoras y fototóxicas del compuesto modelo Lumazina (pteridin-2,4 (1*H*, 3*H*)-diona), derivado no sustituido de las lumazinas. Estos compuestos heterocíclicos se encuentran presentes en la naturaleza cumpliendo diversas funciones. Las conclusiones generales más relevantes de este trabajo se detallan a continuación, separados en tres secciones.

1) Caracterización fotoquímica y fotofísica de Lumazina. Se estudiaron algunas propiedades fotoquímicas y fotofísicas de Lumazina (Lum) en dos condiciones de pH, dado que esta molécula presenta un equilibrio ácido-base con un valor de pK_a alrededor de 8. Por ello, todos los estudios se realizaron a pH lo suficientemente alejado de dicho valor, con el objeto de asegurar, en los distintos experimentos, la presencia de una única forma ácido base de Lum. Los resultados generales obtenidos son:

- Se observa una fuerte dependencia de la emisión fluorescente de Lum con el pH, siendo mayor el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) de la forma alcalina que el de la ácida. Asimismo no se observa desactivación del primer estado singlete excitado por O_2 . Del mismo modo, el tiempo de vida (τ_F) de fluorescencia es mayor para la forma alcalina respecto a la ácida.
- Se obtuvieron los tiempos de vida del triplete (τ_T) para las dos condiciones de pH y se observó que el mismo se desactiva frente al O_2 , con constantes bimoleculares de desactivación ($k_q^{O_2}$) relativamente altas.
- El anión yoduro es capaz de desactivar ambos estados excitados de Lum, sin embargo, la desactivación del estado excitado singlete ocurre a valores de concentración de yoduro mucho más altas, que las necesarias para desactivar el estado excitado triplete. Esta propiedad convierte al yoduro, bajo ciertas condiciones de concentración, en un desactivador selectivo del triplete de Lum.
- La degradación fotoquímica de Lum tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas presenta rendimientos cuánticos muy bajos, por lo que Lum podría ser considerado como un compuesto fotoestable.
- Ambas formas ácido-base de Lum generan 1O_2 fotoquímicamente con rendimientos cuánticos relativamente elevados, siendo la forma ácida un sensibilizador de 1O_2

mucho más eficiente. Las constantes de velocidad de desactivación total (k_t) encontradas son relativamente bajas.

 Soluciones aireadas de Lum expuestas a radiación UV generan $O_2^{\bullet-}$.

En la siguiente tabla se listan los valores obtenidos para los distintos parámetros fotofísicos y fotoquímicos investigados:

	Φ_F	τ_F (ns)	τ_T (μ s)	$k_q^{O_2}$ ($M^{-1} s^{-1}$)	Φ_Δ	Φ_{Lum}
Forma ácida	$0,10 \pm 0,01$	$5,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,5$	$(7 \pm 1) 10^8$	$0,49 \pm 0,03$	$(2,0 \pm 1,0) 10^{-4}$
Forma alcalina	$0,26 \pm 0,02$	$7,6 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,5$	$(1,2 \pm 0,1) 10^9$	$0,20 \pm 0,02$	$(2,7 \pm 0,7) 10^{-4}$

2) *Efectos fotosensibilizadores de Lumazina sobre nucleótidos.* Estos estudios se realizaron utilizando nucleótidos purínicos, en dos condiciones de pH, para evaluar cada forma ácido-base de Lum individualmente.

 Los nucleótidos 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP) y 2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato (dGMP) se consumen en presencia de Lum e irradiación UV en soluciones acuosas aireadas. La velocidad de la reacción y los mecanismos de fotosensibilización implicados varían de acuerdo al nucleótido y al pH empleado.

 La oxidación de dAMP fotosensibilizada por Lum ocurre solamente en medio ácido, mediante un mecanismo Tipo I. Durante la reacción se consume el nucleótido y O_2 , la concentración de Lum permanece constante y se produce H_2O_2 . Además, se forma $O_2^{\bullet-}$ que participa en el mecanismo como inhibidor del consumo de dAMP.

 La oxidación de dGMP fotosensibilizada por Lum en medio ácido y alcalino ocurre mediante una combinación de mecanismos Tipo I y Tipo II. El nucleótido se consume en presencia de ambas formas ácido-base de Lum sólo en condiciones aeróbicas. Durante la reacción no se consume Lum, se consume O_2 , se produce H_2O_2 y varios productos polares. Adicionalmente se encontró que se produce $O_2^{\bullet-}$, que actúa como inhibidor de la reacción. Cálculos cinéticos empleando los valores de k_r^{dGMP} y experimentos realizados en D_2O muestran que la fotooxidación en

ambos medios ocurre principalmente vía transferencia de electrones, aunque la vía mediada por $^1\text{O}_2$ también contribuye al proceso global.

3) **Efectos fotodinámicos sobre células eucariotas.** Estos estudios se realizaron utilizando una línea cancerígena de células eucariotas, las células HeLa, a pH fisiológico. Se evaluó la incorporación de Lum por células HeLa. Finalmente, se estudió la toxicidad de Lum sobre estas células en ausencia y en presencia de radiación UV-A.

- ☞ Lum interacciona con las células, pudiendo, o bien penetrar y localizarse dentro de dominios intracelulares o, al menos, asociarse a las membranas de las mismas.
- ☞ Lum no es un compuesto tóxico para las células en condiciones de oscuridad, observándose que no hay alteraciones en la viabilidad celular durante incubaciones en medios conteniendo Lumazina.
- ☞ Bajo irradiación UV-A se observa pérdida de la integridad de estructuras en las células incubadas con Lum, con la inevitable muerte celular. Por ello, Lum tiene efectos fotodinámicos.

Finalmente, este trabajo de tesis ha demostrado que Lum es un compuesto fotoestable que produce, bajo irradiación UV, especies reactivas de oxígeno, fotoinduce la oxidación de biomoléculas y tiene efecto fototóxico sobre células eucariotas. Por consiguiente, las lumazinas deben ser tenidas en cuenta como potenciales fotosensibilizadores biológicos.

